Beiträge zur Physiologie der farblosen Schwefelbakterien.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Philosophischen Fakultät der Vereinigten Friedrichs-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt

von

Friedrich Keil
aus Weißenfels a. Saale.

ACAD.
LUGD. BAT.
BIBL.

Halle a. S.
1912.

Referent: Prof. Dr. **G. Karsten.**

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1912.

Erscheint auch in: Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Begründet von Prof. Dr. Ferd. Cohn, herausgegeben von Dr. Felix Rosen, Band XI, S. 335 ff.

Meinen lieben Eltern!

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41544726_0070

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. Einleitung. Ältere physiologische Untersuchungen und Anschauungen über die Ernährung von Schwefelbakterien 1

II. Vorkommen und Ernährung der Schwefelbakterien 3

1. Vorkommen der Schwefelbakterien in der Natur und Anordnung der Rohkulturen 3

2. Ernährung der farblosen Schwefelbakterien . . . . . , 5

3. Methodik 6

4. Bestimmung der für die Schwefelbakterien günstigen Partiärdrucke von Sauerstoff und Schwefelwasserstoff 7

5. Bedeutung der Kohlensäure für die Physiologie der farblosen Schwefelbakterien 9

Tabellen 12

Tabellen für die Kulturversuche in kohlensäurefreier Atmosphäre . 15

III. Gewinnung der Reinkulturen 15

1. Reinkultur von Thiotrix 15

2. Die Reinkultur von Beggiatoa 16

IV. Bestimmung der anorganischen und organischen Stoffe, welche zur Ernährung der Schwefelbakterien geeignet sind 18

Stickstoffquellen für die Schwefelbakterien 20

Die Wirkung organischer Stoffe auf die farblosen Schwefelbakterien 23

Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der farblosen Schwefelbakterien 26

V. Einige morphologische und entwicklungsgeschichtliche Beobachtungen 28

VI. Zusammenstellung der wesentlichen Resultate 31

Übersicht über die physiologischen Eigenschaften autotropher Bakterien 33

Protokolle 34

I. Einleitung.

Ältere physiologische Untersuchungen und Anschauungen über die Ernährung von Schwefelbakterien.

Die eigentümliche, physiologisch überaus interessante Gruppe der Schwefelbakterien ist, seit Cramer[1]) 1870 zeigte, daß die dunkeln, stark lichtbrechenden Körnchen in den Bakterienzellen aus Schwefel bestehen, mehrfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen.

Meist beschränken sich die Arbeiten[2]) auf morphologische und entwicklungsgeschichtliche Darstellungen, sowie einige theoretische Betrachtungen über die Bedeutung des Schwefels für die Lebensvorgänge der Bakterien. Erst Winogradsky unterzog die Schwefelbakterien, besonders die Gattungen Beggiatoa und Thiothrix einer eingehenden morphologischen und physiologischen Untersuchung, deren Ergebnisse er in mehreren Arbeiten niederlegte[3]). In der ersten, für die Physiologie der Schwefelbakterien grundlegenden Abhandlung faßt er die Ergebnisse folgendermaßen zusammen: „1. Sie (die Schwefelbakterien) oxydieren Schwefelwasserstoff und speichern Schwefel in Form von kleinen Kügelchen auf, welche aus amorphem weichem Schwefel bestehen und innerhalb der lebenden Zellen nie in den kristallinischen Zustand übergehen. 2. Sie oxydieren diesen Schwefel zu Schwefelsäure, welche durch die aufgenommenen Carbonate gleich neutralisiert und in Form von Sulfaten ausgeschieden wird. Es werden also durch ihre Tätigkeit die Carbonate des Substrats in Sulfate umgewandelt.

---

[1]) Christian Müller, Chemisch-physik. Beschreibung der Thermen von Baden i. d. Schweiz. 1870.

[2]) Ferdinand Cohn, Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Bd. 1, Heft 3. 1875. Lothar Meyer, Journal für praktische Chemie. Bd. 91. 1864. Weitere Literat. s. Winogradsky.

[3]) Sergius Winogradsky. I. Über Schwefelbakterien. 1887. Bot. Ztg. 45. Jahrg. II. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Bakterien I. Schwefelbakterien. Leipzig 1888. III. Recherches sur les sulfobactéries. Ann. de l'Insitut Pasteur 1883. 3ième année. No. 2.

3. Ohne Schwefel werden Ernährungsprozesse und Bewegung sistiert und es tritt früher oder später der Tod, bei einigen vielleicht ein Ruhezustand (?) ein. 4. Sie können leben und sich sehr üppig vermehren in einer Flüssigkeit, die nur Spuren von organischen Substanzen enthält, von denen andere chlorophyllose Organismen nicht leben können."

Die ersten drei Punkte dieser Zusammenfassung, die die Schwefeloxydationsprozesse angehen, hat man auch in der Folge als richtig anerkannt. Was aber den vierten Satz anbetrifft, so sind, angeregt durch Beobachtungen an anderen Bakterienformen, weitergehende Hypothesen aufgestellt worden. Den schärfsten Ausdruck finden diese wohl bei Jost[1]). Er sagt: „Wenn wir jetzt nach Besprechung der Nitrobakterien zurückblicken auf die Verhältnisse, die wir bei den farblosen Schwefelbakterien angetroffen haben, so erscheinen uns diese in einem ganz neuen Licht. Nicht nur die Veratmung von NH_3 einerseits und SH_2 andererseits springt in die Augen, sondern auch der schlechte Erfolg organischer Nährstoffe bei Beggiatoa gibt zu denken. Es ist im höchsten Grade wahrscheinlich (Winogradsky 1890, S. 275), daß auch die Schwefelbakterien autotrophe Organismen sind, und daß sie bei vollkommenem Ausschluß organischer Nährstoffe besser gedeihen, als mit den ihnen gebotenen schlechten Nährstoffen." Ähnlich äußert sich Benecke[2]): „Die Autotrophie des Kohlenstoffes bei Bakterien, d. h. die Assimilation der Kohlensäure, ist zum ersten Male durch Winogradsky festgestellt worden. Der erste, der die Wahrscheinlichkeit betonte, daß auch noch andere Bakterien mit »mineralischer Atmung« Kohlensäure zu reduzieren vermöchten, ist wohl Godlewski. Zu diesen würden wahrscheinlich die Eisenbakterien und die Schwefelbakterien zu rechnen sein, von denen allerdings bis jetzt erst feststeht, daß sie in bezug auf die Kohlenstoffquelle sehr anspruchslos sind." Weiter dann noch: „Obligat stickstoffautotroph sind voraussichtlich auch ferner die Beggiatoen, Thiothrixarten und andere von Winogradsky studierte Schwefelbakterien."

Wenn man nun die Winogradskyschen Untersuchungen über die Bedeutung des Schwefels für die Lebensäußerungen der Schwefelbakterien als noch heute geltend anerkennen muß, so weisen sie doch einen großen Mangel auf. Er arbeitete ausschließlich mit Objektträgerkulturen, die wohl zu einer Orientierung recht gut geeignet sein mögen, aber vor allen Dingen nie eine völlige Reinheit der Kulturen erreichen lassen; außerdem verwendete er Nährlösungen von nicht ge-

[1]) Ludwig Jost, Vorlesungen über Pflanzenphysiologie. 2. Aufl. Jena 1908.
[2]) Franz Lafar, Handbuch der technischen Mykologie. Erster Band. Jena 1904—1907.

nau bekannter Zusammensetzung, in denen kleine Mengen organischer Stoffe zugegen waren. So ist es ihm nicht gelungen, die physiologischen Verhältnisse vollkommen klarzustellen.

II. Vorkommen und Ernährung der Schwefelbakterien.

Ich habe mich nun bemüht, die oben angedeuteten Fragen über die Physiologie der Schwefelbakterien zu lösen. Meine Arbeit, die ich auf Veranlasung des Herrn Prof. Dr. Karsten unternommen habe, baut sich im wesentlichen auf den oben angeführten Ergebnissen der Winogradskyschen Untersuchungen auf.

1. Vorkommen der Schwefelbakterien in der Natur und Anordnung der Rohkulturen.

Bei Beginn meiner Untersuchungen bemühte ich mich, Beggiatoa-Rohmaterial auf die von Winogradsky[1]) angegebenen Weise mit Butomusrhizom, Gips und Wasser in hohen Glaszylindern zu erhalten. Nie habe ich auf diese Weise für meine Zwecke brauchbare Resultate erzielen können; standen die Kulturen im Licht, so trat eine lebhafte Entwicklung roter Bakterien ein. Im Dunkeln zeigte sich überhaupt keine Entwicklung von Schwefelbakterien.

Dagegen bot ein Abflußgraben der Weißenfelser Papierfabrik, dessen Grund eine dicke Schicht schwarzen Schlammes aufweist, große Mengen von Schwefelbakterien, die oft weite Strecken mit einem weißen Filz überzogen. Ende Mai 1911 entwickelten sich dann auch an den Ufern der Saale, so weit diese mit Schlamm überzogen waren, außerordentlich reiche Mengen von Beggiatoa und Thiothrix. Von dem so gebotenen Material habe ich Rohkulturen auf folgende Weise hergestellt. Auf den Boden einer 3—4 cm hohen Glasschale wurde eine Schicht schwarzen, schwefelbakterienhaltigen Schlammes gebracht und darüber 2—3 cm hoch Wasser gegossen. Anfangs wurde Saalewasser, nachdem es von den gröbsten Verunreinigungen durch mehrmalige Filtration befreit war, verwendet. In solchen Kulturen entwickelte sich dann in kurzer Zeit eine üppige Schwefelbakterienvegetation. Eigentümlich war es, daß durch irgend einen Zufall die beiden von mir behandelten Bakteriengruppen selten im gleichen Gefäß wuchsen. Beggiatoa (Speziesunterscheidung blieb unberücksichtigt, da alle nur durch ihre Dicke unterschiedenen Formen sich physiologisch gleich verhielten) bildete stets einen rein weißen mehrschichtigen Überzug über dem Schlamm. Einzelne Fädchen vereinigten sich dann wohl auch zu kleinen Klümpchen, die in die Flüssigkeit hineinragten. Auch der Rand der Schalen, soweit er mit Wasser bespült wurde, war meist von schönen, reinen

[1]) cf. S. 1, 3. I.

Netzen überzogen. Etwas anders war das Aussehen der Thiothrix-Kulturen. (Für die verschiedenen Spezies von Thiothrix gilt das gleiche wie bei Beggiatoa.) Diese bildeten keine so schönen, weißen Netze. Der Schlamm war ganz von einem grau-weißen Filz überzogen und dann, was äußerst charakterisch ist, war die ganze Flüssigkeitsoberfläche mit zahlreichen Kolonien von Thiothrix bedeckt, die im Gegensatz zu den Beggiatoen nicht auf der ganzen Fadenlänge krochen, sondern mit einem Ende dauernd festgeheftet blieben. Die Haftscheiben waren an Salzkristallen oder kleinen schwebenden Schlammteilchen befestigt, und die freien Fadenenden ragten in das Wasser hinein. Als wesentlich erwies sich noch, die Kulturen im Dunkeln zu halten, da auf diese Weise kein Wachstum der störenden Oscillarien stattfand. Dies trifft jedoch nicht zu für die Wintermonate, wo die Lichtenergie am Nordfenster nicht hinreichte, um den Oscillarien genügende Assimilation zu ermöglichen. In den eben beschriebenen Kulturen habe ich Schwefelbakterien Sommer und Winter in reichen Mengen zur Verfügung gehabt. Erforderlich war es nur, von Zeit zu Zeit frisches, kohlensaure Salze anhaltendes Wasser hinzuzufügen. Eine ähnliche Kulurmethode beschreibt Molisch[1]). Er beschickt ein Glasgefäß 2 bis 3 cm hoch mit schwärzlichem Sumpfschlamm, übergießt ihn mit Leitungswasser und fügt eine Hand voll getrockneter Elodeasprosse und auf einen Liter Wasser einen halben Teelöffel voll Gips hinzu.

Die Schwefelbakterienvegetation im Freien blieb während der heißen Sommer- und Herbstmonate immer gleich schön; erst gegen Ende des Jahres, als die Wassertemperatur stark sank, trat ein allmähliches Zurückgehen des weißen Uferbelages ein. Man konnte dann oft beobachten, wie die Beggiatoen sich, in dichte Stränge gelegt, in die tieferen Schlammschichten zurückzogen. Es mag dies wohl seinen Grund in der verringerten Schwefelwasserstoffproduktion des Schlammes haben. In diesem Zustand hielten sich ziemlich beträchtliche Mengen von Schwefelbakterien während der kühlen Jahreszeit; denn wurde selbst unter dem Eise hervor etwas Schlamm geholt und in den warmen Arbeitsraum des Instituts in Rohkultur gebracht, so war binnen zweier Tage der schönste weiße Überzug vorhanden. Mitte April 1912 bei 10—15° Wasserwärme bildeten die Schwefelbakterien wieder deutlich sichtbare Rasen am Saaleufer.

Einige recht interessante Beobachtungen gestattete auch eine künstliche Schwefelquelle, welche ich im Keller des Instituts nach den von Winogradsky[2]) gemachten Angaben herrichtete. Als Kulturgefäße benutzte ich zwei Holzkübel, sonst habe ich bis auf einige

[1]) Hans Molisch, Centralblatt für Bakteriologie etc. 2. Abt. 33 Bd. Jena 1912.
[2]) cf. S. 1. 3 I, S. 537.

unwichtige Einzelheiten genau die gleiche Versuchsanstellung verwendet wie Winogradsky. In dieser Schwefelquelle habe ich Schwefelbakterien vom 19. Oktober 1911 bis Ende März 1912 gezogen. Als Ausgangsmaterial brachte ich in den einen Kübel ein Schälchen mit Beggiatoa und einige Butomusrhizomstücke. Nach einigen Wochen hatten sich die Beggiatoen etwas vermehrt, jedoch nur ganz wenig; auf dem Holz des Kübels, soweit es von Wasser bespült wurde, zeigte sich aber ein weißlicher, flutender Belag, den ich bei näherer Untersuchung als eine sehr üppige Thiothrixvegetation erkennen konnte. Eine reichere Vermehrung der Beggiatoen trat erst ein, als das Wasser aus dem ersten Kübel in einen zweiten, weit flacheren, übergeleitet wurde. In kurzer Zeit war in letzterem der Boden und teilweise auch die Wände mit einem sehr dichten Beggiatoanetz überzogen. Das so vorhandene Schwefelbakterienmaterial zeichnete sich durch große Reinheit aus, ohne jedoch den Anforderungen einer vollkommenen Reinkultur zu genügen. Besonders Infusorien bildeten die ständigen Begleiter der Schwefelbakterien.

Das eigenartige Verhalten der beiden Schwefelbakterienformen in den Holzkübeln läßt sich mit den von Winogradsky an natürlichen Schwefelquellen gemachten Erfahrungen[1]) leicht erklären. Die als Ausgangsmaterial in den tiefen Kübel gebrachten Beggiatoen fanden dort nicht die ihnen zusagende Sauerstoffmenge, die Thiothrixfäden dagegen sind gegenüber Schwankungen der Gasspannung nicht so empfindlich, außerdem mag auch der Wasserstrom in dem ersten Kübel etwas stark gewesen sein, so daß die Beggiatoen sich nur schwer halten konnten, während die außerordentlich festsitzende Thiothrix gerade hier ihre günstigen Lebensbedingungen fand. Die für Beggiatoa ungünstigen Einflüsse waren in dem zweiten Gefäß nicht vorhanden. Das Wasser wurde von der Oberfläche aus zugeführt und auch gleich nahe der Zuflußstelle wieder abgeleitet. Bei der so erreichten Scheidung der Schwefelbakterien blieb es während der ganzen Zeit der Kulturdauer, die man wohl beliebig lange hätte ausdehnen können. Da es für die Frage nach der Bedeutung des Lichtes für Schwefelbakterien von Interesse ist, will ich gleich hier einfügen, daß die Holzkübel fast unter vollständigem Lichtabschluß standen.

2. Ernährung der farblosen Schwefelbakterien.

Lange Zeit habe ich mich vergeblich bemüht, die Schwefelbakterien in Reinkultur zu bekommen. Dies mag zum Teil seinen Grund in der bei den Isolierungsversuchen angewendeten mechanischen Reizung, wie auch in den zum großen Teil noch unerforschtem Er-

[1]) cf. S. 1. 3, I, S. 530.

nährungsbedingungen gehabt haben. Somit war es notwendig, zunächst die Bedingungen für das Leben der Schwefelbakterien festzustellen. Auf Vorschlag von Herrn Dr. Pringsheim suchte ich durch Herstellung einer geeigneten schwefelwasserstoffhaltigen Atmosphäre das Wachstum der Schwefelbakterien zu fördern.

Bei den nun zu beschreibenden Versuchen ging ich von der Überlegung aus, daß es möglich sein müsse, ein Gasgemisch herzustellen, welches den Schwefelbakterien das Leben ermöglicht. Daß Schwefelwasserstoff und Sauerstoff unbedingt notwendig sind, unterlag keinem Zweifel, auch die günstige Wirkung von Kohlensäure war nach den oben mitgeteilten Anschauungen sehr wahrscheinlich gemacht. So handelte es sich nur noch darum, die geeignete Versuchsanordnung zu finden.

3. Methodik.

Die Lösung der weiter unten zu beschreibenden, physiologischen Einzelfragen gelang mit Hilfe des folgenden Apparates: In den Tubus einer am unteren Rande abgeschliffenen Glasglocke wurde ein doppelt durchbohrter Gummistopfen fest eingedrückt. Durch die eine Bohrung führte ein Glashahn, durch die andern ein gebogenes Glasrohr, beide ragten ein kurzes Stück in die Glocke hinein. Über den Gummistopfen wurde dann eine Schicht Quecksilber gebracht und das Ganze mit einem Siegellackmantel überzogen, so daß ein luftdichter Abschluß erreicht war. Um eine Glasdiffusion aus dem Gummi zu vermeiden, erhielt die Innenseite des Stopfens einen ziemlich starken Paraffinüberzug. Die Außenseite des offenen Rohres trug mit Hilfe eines kurzen Stückes Luftpumpenschlauch ein abgekürztes Barometer. Um Ungenauigkeiten zu vermeiden, war das Stück des an den inneren Luftraum grenzenden Gummis möglichst klein gemacht. Der untere Rand der Glocke, mit einer dünnen Schicht Luftpumpenfett versehen, wurde auf eine mattgeschliffene Glasplatte aufgesetzt. Zum Auspumpen der Glocken diente eine Ölluftpumpe. Unter solche Glocken wurden dann die Kulturen gebracht. Diese waren folgendermaßen hergestellt: Als Kulturgefäße dienten Petrischalen, in welchen sich eine kleine Menge Nährflüssigkeit befand. In diese wurden dann ein kleines Flöckchen, bei dickeren Formen[1]) einzelne Fäden von Schwefelbakterien eingeimpft. Unter jeder Glocke befanden sich 5—6, in der letzten Zeit 10 solcher Schalen. Als Nährflüssigkeit für die Kulturen diente im Anfang das Wasser der Langenbrücker Schwefelquelle „Waldquelle", welches auch Winogradsky bei seinen Untersuchungen verwendete. Weitere Nährflüssigkeiten werden an geeigneter Stelle

[1]) Die Dicke der von mir untersuchten Bakterien schwankte bei Beggiatoa zwischen 1 μ und 5 μ, bei Thiothrix zwischen 1 μ und 2,5 μ.

besprochen werden. Die Herstellung der Kulturatmosphäre geschah auf folgende Weise. Zunächst wurde die Luft aus den Glocken bis zu einem gewissen Druck entfernt, um die Partiärpressung des Sauerstoffes auf einen günstigen Betrag zu bringen. Dann wurde Schwefelwasserstoff[1]) mit Kohlensäure in einem vorher berechneten Verhältnis gemischt. Die Mischung fand statt, weil die geringen Schwefelwasserstoffmengen, die vertragen werden, keine direkte Ablesung am Barometer gestatteten. Ich benutzte dabei folgende recht bequeme Methode: In einen weiten, mit Wasser gefüllten Glaszylinder wurde ein Meßzylinder umgekehrt hineingestülpt. Bis zu dem Boden des umgekehrten Gefäßes führte ein U-förmig gebogenes Rohr mit ausgezogener Spitze. An dem äußeren freien Ende war ein Stück Gummischlauch mit einem Quetschhahn befestigt. In diesem Gasometer mischte ich ein kleines, genau bekanntes Volumen Schwefelwasserstoff (die Zahl der Kubikzentimeter ließ sich leicht am Meßzylinder ablesen) mit einem weit größeren Volumen Kohlendioxyd. Dieses Gemenge beließ ich einige Minuten im Gasometer, um eine gleichmäßige Vermischung der Gase zu erreichen. Darauf wurde eine, je nach dem Volumen des zu füllenden Kulturraumes verschiedene Menge in die Glocken abgesogen. Der so in der Kulturatmosphäre geschaffene Partiärdruck beider Gase ließ sich durch vergleichende Messungen mit größeren Gasmengen und Umrechnung feststellen. Der in der Glocke dann noch verbliebene Unterdruck mußte durch ein indifferentes Gas ausgeglichen werden, denn die Kulturen gediehen, wie sich später zeigte, bei einem Unterdruck von mehreren hundert Millimetern nicht. Bei den Versuchen wurde zum Ausgleich Wasserstoff aus einer Bombe benutzt, und zwar erfolgte eine Auffüllung bis auf wenige Millimeter Unterdruck, welche belassen wurden, um ein Loslösen der Glocken bei Temperaturschwankungen zu vermeiden. Die verwendeten Petrischalen erwiesen sich als recht brauchbar, denn die Deckel schlossen nie so dicht, um einen Gasausgleich zu verhindern und ermöglichten doch ein sauberes Arbeiten, da fremde Keime nicht hineingelangen konnten.

4. Bestimmung der für die Schwefelbakterien günstigen Partiärdrucke von Sauerstoff und Schwefelwasserstoff.

In dem Langenbrücker Schwefelwasser stand mir eine Nährflüssigkeit zur Verfügung, die, wie aus Winogradskys Versuchen hervorgeht, dem Mineralstoffbedürfnis der Schwefelbakterien genügt. Ich konnte daher meine Aufmerksamkeit zunächst auf die Bestimmungen

---

[1]) H_2S wurde aus FeS und verdünnter H_2SO_4 im Kippschen Apparat hergestellt. Vor dem Gebrauch wurde er sorgfältig mit Wasser gewaschen. Ebenso die aus Marmor und verdünnter HCl hergestellte CO_2.

der Partiärdrucke richten, unter welchen Sauerstoff und Schwefelwasserstoff am günstigsten auf das Wachstum der Schwefelbakterien einwirken. Zunächst soll hier die Bestimmung des geeigneten Sauerstoffdruckes eingehender besprochen werden. Eine Trennung der Darlegungen für Sauerstoff und Schwefelwasserstoff machte sich der Übersichtlichkeit halber notwendig, in Wirklichkeit verliefen ja, wie auch weiter unten Tabellen und Protokolle zeigen werden, die diesbezüglichen Untersuchungen völlig nebeneinander. Da sich für die Größen der Partiärdrucke fast keine Anhaltspunkte boten, wurden zunächst bei den einzelnen Versuchen die Bedingungen möglichst verschieden gestaltet, um ungefähr ein Bild der gesuchten Grenzen zu erhalten.

Die Bestimmung der oberen Grenze des Sauerstoffdruckes gestaltete sich verhältnismäßig einfach. Brachte man eine Petrischale mit einem frisch eingeimpften Flöckchen Beggiatoa in Langenbrücker Wasser unter eine der Kulturglocken, so war ein zu hoher Sauerstoffdruck in der hergestellten Atmosphäre leicht zu bemerken. Das Beggiatoaklümpchen ballte sich dann ganz dicht zusammen und schwamm in der Flüssigkeit. Ging man mit dem Sauerstoffdruck tiefer, so war zu bemerken, wie bei ungefähr 100 mm Luftdruck = 20 mm Sauerstoffdruck die Klümpchen sich langsam zu lösen und die Fäden auf dem Boden der Petrischale zu kriechen begannen. Wenn an Stelle der atmosphärischen Luft reines Sauerstoffgas verwendet wurde, zeigte sich bei ungefähr 20 mm Druck, also bei demselben Sauerstoffdrucke wie in 100 mm Luft, die eben beschriebene Auflösung der Beggiatoaknäuel. Etwas langwieriger als diese Festlegung der oberen Partiärdruckgrenze gestaltete sich die der unteren, denn hierbei bot sich kein so leicht erkennbares Zeichen, in welcher Weise eine gegebene Sauerstoffspannung wirkte, ob sie günstig oder zu niedrig war. Es mußten dann die Wachstumserscheinungen den Ausschlag geben. Zu starke Abweichungen von der unteren Grenze riefen bei Beggiatoa Zerfall der unter günstigen Verhältnissen sehr langen Fäden in kurze, wenige Zellen enthaltende Stücke hervor, die völlig unbeweglich waren. (Die Kontrolle der Kulturen wurde mit Hilfe des Mikroskopes ausgeführt. Meist wurde der Schalendeckel ohne besondere Vorsichtsmaßregeln abgehoben, bei reineren Kulturen wurde eine dünne Glasplatte zum Schutz verwendet; in der letzten Zeit unterblieb jedoch auch dies.) Mittels der beschriebenen Beobachtungen gelang es schließlich, als untere Grenze des Sauerstoffpartiärdruckes die in 50 mm Luft vorhandene Sauerstoffmenge (10 mm reines Sauerstoffgas) festzulegen. Am vorteilhaftesten erwies sich im weiteren Verlauf der Untersuchungen der Mittelwert zwischen den beiden Grenzen, d. i. ein Sauerstoffdruck von 15 mm = 75 mm Luftdruck.

Durch Beobachtungen, die denen zur Bestimmung des Sauerstoffdruckminimums ähnlich waren — die Reaktion bestand hier ebenfalls in dem Zerfall der Fäden in kurze Stückchen bei zu hohem und zu tiefem Druck —, gelang es auch, die Grenzen des zum Leben der Schwefelbakterien erforderlichen Schwefelwasserstoffdruckes festzulegen. Besonders die Kulturen mit den sehr empfindlichen Beggiatoen erleichterten diese langwierigen Untersuchungen ganz wesentlich und gaben auch einen Anhalt für die Experimente mit Thiothrix. Bei dieser Form konnte nur das Wachstum eine Entscheidung geben, doch sind die Grenzen von denen für Beggiatoa nicht sehr verschieden, höchstens um einige Millimeter nach oben und unten weiter. Umrechnungen der im Raummaß festgestellten Schwefelwasserstoffmengen ergaben Druckgrenzen von 0,6 und 1,7 mm. Der günstigste und daher weiterhin meist verwendete Druckwert lag für beide Organismen bei 0,8 mm. (Dies bedeutet auf eine Glocke von 4500 ccm Volumen eine Schwefelwasserstoffmenge von 5 ccm.)

5. Bedeutung der Kohlensäure für die Physiologie der farblosen Schwefelbakterien.

Nach den Darlegungen über die Bestimmung der Partiärdrucke von Sauerstoff und Schwefelwasserstoff soll in diesem Abschnitt die physiologische Bedeutung der Kohlensäure für die Schwefelbakterien besprochen werden. Als ich bei meinen ersten Untersuchungen über Schwefelbakterien in Objektträgerkulturen versuchte, das meist ohne besondere Vorbehandlung verwendete Langenbrücker Schwefelwasser durch Erhitzen zu sterilisieren, fielen beträchtliche Mengen von Salzen aus. Benutzte ich derart behandeltes Wasser bei meinen Kulturversuchen, so waren die Resultate stets schlecht, die Schwefelbakterien starben ab, so oft auch die Lösung erneut wurde. Ebenso verhielt es sich bei den weiter unten zu besprechenden künstlichen Nährlösungen. Ähnlich gestaltete sich die Sache, als anstatt der Sterilisation durch Erhitzen diejenige durch Filtration mit Hilfe von Tonfiltern[1]) angewendet wurde. (Dabei wurden dem Wasser beträchtliche Mengen darin gelöster Gase entzogen.) Auch in derart behandeltem Langenbrücker Wasser gediehen die Objektträgerkulturen nicht. Eine Erklärung für diese Mißerfolge brachten die Kulturen in den Glocken, wenn anstatt des Gemisches von Schwefelwasserstoff und Kohlensäure ein solches von Schwefelwasserstoff und Wasserstoff verwendet wurde. Trotzdem sonst alle übrigen Verhältnisse genau die gleichen waren,

[1]) Nähere Angaben über Sterilisationsverfahren siehe bei Ernst Küster, Kultur der Mikroorganismen. 1907. S. 50.

wie gewöhnlich, gingen die Kulturen in wenigen Tagen ein. Dieses Ergebnis wies darauf hin, daß das Fehlen der Kohlensäure Ursache des Absterbens war. Man mußte danach annehmen, daß die in den 75 mm Luft verbliebene Kohlensäuremenge zur Ernährung der Schwefelbakterien zu gering war.

Um aber völlig sichere Grundlagen für meine Annahme der Kohlensäurenotwendigkeit zu haben, stellte ich weitere Versuche an. So weit als möglich entfernte ich die Luft aus den Kulturglocken und ließ kohlensäurefreie Luft dafür einströmen. Die Befreiung der Luft und zuletzt des Wasserstoffes von der Kohlensäure geschah mittelst Leiten der Gase durch mehrere Röhren, die mit konzentrierter Kalilauge getränkte Bimssteinstücke enthielten und eine ebenfalls Kalilauge enthaltende Waschflasche. Das starke Auspumpen und Auffüllen ohne CO_2 wiederholte ich 2 bis 3 Mal um eine möglichst kohlensäurefreie Atmosphäre zu erzielen. Nach dem letzten Evakuieren wurde dann das Gemisch von Schwefelwasserstoff mit Wasserstoff eingeleitet, nachdem es durch eine Waschflasche mit einer konzentrierten Lösung von Schwefelkalium in Wasser gesogen war. Die K_2S-Lösung wurde angewendet, da sie wie die Kalilauge Kohlensäure absorbiert, nicht aber den Schwefelwasserstoff. Die in diesen Glocken befindlichen Kulturen zeitigten sehr merkwürdige Ergebnisse. Die meisten der Petrischalen enthielten nach kurzer Zeit durchweg tote Fäden; einige dagegen wiesen eigenartige Bildungen auf. Eine große Menge Fäden hatten sich in einem Kreis um gewisse Verunreinigungen angeordnet und hielten sich noch geraume Zeit lebend. Eine Erklärung dieser auffallenden Bilder ist unschwer zu geben. Wie man mikroskopisch leicht erkannte, lagen im Zentrum des Kreises zahlreiche fremde Organismen (Cyanophyceen, Infusorien), welche sicher bei ihrem Stoffwechsel im Dunkeln auch Kohlensäure mit abschieden; diese diente dann den Beggiatoen zur Assimilation. Die Erscheinung habe ich beliebig oft wiederholen können, indem ich in die Kulturen absichtlich Verunreinigungen brachte. Im ganzen habe ich vielleicht an 50 Kulturen, welche vorher in normal, d. h. mit Kohlensäure gefüllten Glocken vorzüglich gediehen, das Absterben unter den eben geschilderten Bedingungen beobachtet. Man könnte vielleicht einwenden, die Bakterien seien infolge der Vorbehandlung zugrunde gegangen; diesen Einwand kann ich wohl am besten dadurch widerlegen, daß ich, nachdem die Kulturen wie oben beschrieben vorbehandelt waren, zur Probe den Schwefelwasserstoff mit Kohlensäure gemischt hinzugab und dann stets sehr gute Kulturen erhielt. Auch an Thiothrixkulturen habe ich diese Versuche mit bestem Erfolg angestellt, ohne aber hier die Erhaltung durch die CO_2-Abgabe fremder Lebewesen beobachten zu können. Schließlich will ich auch noch erwähnen, daß Kulturen auf den Objektträger (nach Wino-

gradsky) recht gut gelangen, nachdem den oben erwähnten unbrauchbaren Nährflüssigkeiten Kohlensäure zugesetzt war.

Durch die eben dargestellten Untersuchungen ist wohl einwandsfrei erwiesen worden, daß die Schwefelbakterien zu ihrer Ernährung notwendig der Kohlensäure bedürfen. Jedenfalls kommen die in Spuren im Langenbrücker Wasser vorhandenen organischen Substanzen[1]) nicht als Kohlenstoffquelle in Betracht. Daß auch andere organische Stoffe nicht dafür verwendbar sind, werde ich weiter unten zu zeigen haben. Diese Ergebnisse stehen auch mit dem Vorkommen der Schwefelbakterien in der Natur sehr gut in Einklang. Das Wasser der Schwefelquellen ist stets sehr reich an gelöster Kohlensäure, und an anderen Orten kommen reiche Bildungen von Schwefelbakterien nur da vor, wo Fäulnisprozesse stattfinden, wo ihnen also H_2S und CO_2 neben mineralischen Stoffen in genügender Menge zur Verfügung stehen.

Bestimmungen für die Grenzen des Kohlensäurepartiärdruckes führten zu folgenden Ergebnissen. Die untere Grenze des unbedingt notwendigen Druckes ist ungefähr diejenige, welche dem Kohlensäuredruck der Luft (ungefähr 0,5 mm) entspricht. Als obere Grenze wird ein Druck von 350 mm CO_2 ertragen. Hierbei hefteten sich aber die Beggiatoa- und Thiothrixfäden nicht mehr an das Glas an. Die günstigste Beeinflussung der Wachstums- und Vermehrungsvorgänge erzielte ich, wenn das Gasgemisch ungefähr 25 mm Kohlensäuredruck hatte, jedoch wurden Schwankungen nach oben oder unten nicht als besonders schädigend empfunden.

Vergleicht man die Grenzen der Partiärdrucke für die einzelnen Gase, so liegen diese für Sauerstoff (10 und 20 mm), sowie für Schwefelwasserstoff (0,6 und 1,7 mm) recht nahe beieinander, während sie für Kohlensäure fast eine halbe Atmosphäre Unterschied aufweisen.

Nachdem so die Drucke bestimmt waren, unter welchen H_2S, O und CO_2 am günstigsten auf das Wachstum und die Vermehrung der farblosen Schwefelbakterien einwirken, boten sich kaum noch Schwierigkeiten, diese Lebewesen in Petrischalen beliebig lange zu züchten. Als Beleg für die angeführten Ergebnisse mögen einige kleine Tabellen dienen; am Ende der Arbeit sollen ausführlichere Notizen folgen.

Im wesentlichen wird Versuchsreihe I ein Bild geben, wie die Auffindung des günstigen O-Druckes geschah,

Versuchsreihe II die des H_2S-Druckes,.

Versuchsreihe III die des CO_2-Druckes.

Versuchsreihe VIII soll zeigen, wie zu starker Unterdruck schädigend wirkte.

---

[1]) Siehe die Analyse von Bunsen weiter unten.

Versuchsreihe I. (Erprobung des geeigneten Sauerstoff-Druckes).

Kultur angesetzt	Kultur nachgesehen	Partiärdruck des H_2S in mm	Partiärdruck des O in mm	Partiärdruck der CO_2 in mm	Unterdruck bis auf einige mm ausgegl. oder nicht	Zahl und Zustand der Kulturen
15.12.11	17. 12.	0,8	30	25	ausgegl durch H.	6 Kulturen, tot.
17. 12.	20. 12.	=	=	=	=	6 neue Kulturen, tot.
20. 12. bis	27. 12.	=	=	=	=	Kulturen starben stets ab, wurden erneut, aber nur der gleiche Erfolg.
27. 12.	29. 12.	0,8	20	25	=	Von 9 Kulturen 8 gut, eine tot, diese ersetzt.
fortgeführt bis 15. 1. 12		=	=	=	=	9 Kulturen, nicht schlecht, doch wenig ausgebreitet.
20. 1.	23. 1.	0,8	15	25	=	9 Kulturen, ohne Ausnahme gut.
23. 1.	26. 1.	=	=	=	=	dgl.
26. 1.	30. 1.	=	=	=	=	Dieselben Vermerke.
4. 2.	7. 2.	=	=	=	=	9 Kulturen, sehr gut, deutl. Vermehrung.
bis 6. 4. 12.		=	=	=	=	Stets sehr gute Kult.

Versuchsreihe II. Erprobung des geeigneten Schwefelwasserstoff-Druckes.

Kultur angesetzt	Kultur nachgesehen	Partiärdruck des H_2S in mm	Partiärdruck des O in mm	Partiärdruck der CO_2 in mm	Unterdruck bis auf einige mm ausgegl. oder nicht	Zahl und Zustand der Kulturen
15.12.11	18.12.11	1, 2.	10	12	mit H. ausgegl.	4 Kulturen, Aussehen leidlich.
alle 2 Tage erneutes Gasgemisch bis	29. 12.	=	=	=	=	6 Kulturen, Fäden voll S, lebhaft bewegl.
29. 12.	1. 1. 12	=	=	=	=	Die gleichen Kulturen, leidlich.
fortgesetzt bis						
1. 2. 12	3. 2.	=	=	=	nicht ausgegl.	Die 6 alten Kulturen sehen schlecht aus.
3. 2.	5. 2.	=	=	=	=	Die 6 Kulturen tot.
5. 2.	8. 2.	0,3	20	25	ausgegl.	9 neue Kult., alle tot.
8. 2.	12. 2.	=	=	=	=	9 neue Kult., auch tot.
12. 2.	15. 2.	0,8	15	25	=	9 gute Kulturen, sehen ausgezeichnet aus.
15. 2.	18. 2.	=	=	=	=	Die alt. Kult., sehr gut.
Versuche fortgeführt bis	10. 4.	=	=	=	=	Die alten Kulturen vom 12. 2. sehen sehr gut aus.

Versuchsreihe III. (Bestimmung der unteren H_2S-Grenze.)

Kultur angesetzt	Kultur nachgesehen	Partiärdruck des H_2S in mm	Partiärdruck des O in mm	Partiärdruck der CO_2 in mm	Unterdruck durch H bis auf einige mm ausgegl. oder nicht.	Zahl und Zustand der Kulturen
15.12.12	17. 12.	0,4	15	12	ausgegl.	4 Kulturen, tot.
17. 12.	18. 12.	=	=	=	=	4 neue Kulturen, tot.
18. 12.	19. 12.	=	=	=	=	4 neue Kulturen, wieder tot.
19. 12.	21. 12.	=	10	=	=	6 neue Kulturen, tot.
21. 12.	25. 12.	=	=	=	=	Wieder neue Kulturen, tot.
25. 12.	29. 12.	0,5	15	36	=	8 neue Kulturen, nicht gut.
29. 1.	1. 1. 12	=	=	=	=	Dieselben Kulturen, schlecht.
1. 1. 12	3. 1.	=	=	=	=	Alle 8 Kulturen tot.
3. 1.	5. 1.	0,9	20	36	=	8 neue Kulturen, diese leidlich.
5. 1.	9. 1.	=	=	=	=	Dgl.
fortgef. bis 6. 2.		=	=	=	=	Die 8 Kulturen sind nicht schlecht.
6. 2.	10. 2.	0,8	15	25	=	Die Kulturen sehen besser aus.
fortgef. bis 10. 4.		=	=	=	=	Alle 8 Kulturen ausgezeichnet.

Reihe VI und IX bestätigten lediglich die Resultate von I—III

Versuchsreihe VII. (Einfluß starken Unterdruckes.)

Kultur angesetzt	Kultur nachgesehen	Partiärdruck des H_2S in mm	Partiärdruck des O in mm	Partiärdruck der CO_2 in mm	Unterdruck durch H bis auf einige mm ausgegl. oder nicht	Zahl und Zustand der Kulturen
6. 1. 12	8. 1.	0,8	20	25	nicht ausgegl.	12 Kulturen, sehen leidlich aus.
8. 1.	11. 1.	=	=	=	=	Die 12 Kult. schlecht.
fortgef. bis 29. 1.		=	=	=	=	Stets ungünstige Resultate.
29. 1.	1. 2.	=	15	=	=	12 neue Kulturen, nicht gut.
fortgef. bis 7. 3.		=	=	=	=	Wieder alles schlecht.
7. 3.	11. 3.	=	=	=	ausgegl.	12 neue Kulturen, leidlich.
11. 3.	14. 3.	=	=	=	=	Alle Kulturen sind gut.
14. 3.	18. 3.	=	=	=	=	Dgl.
18. 3.	21. 3.	=	=	=	=	Dgl.
fortgef. bis 6. 4.		=	=	=	=	Stets sehr gute Kultur.

Versuchsreihe IV.

Kultur angesetzt	Kultur nachgesehen	Partiärdruck des H_2S in mm	Partiärdruck des O in mm	Partiärdruck der CO_2 in mm	Unterdruck durch H bis auf einige mm ausgegl. oder nicht	Zahl und Zustand der Kulturen
27.12.11	29. 12.	0,8	6	Nur in Spur. vorh.	Ausgeglichen	4 Kulturen, alle tot.
29. 12.	1. 1. 12	0,9	15	Dgl.	=	6 Kulturen, alle tot.
1. 1.	3. 1.	=	=	=	=	6 neue Kulturen, tot.
fortges.	bis 26. 1.	=	=	=	=	Kulturen nach 3 Tagen stets tot.
26. 1.	28. 1.	0,8	=	völlig ohne CO_2	=	3 Kulturen aus Glocke I waren sehr gut, 2 sind tot.
28. 1.	29. 1.	=	=	=	=	Die dritte Kultur aus Glocke I auch tot.
29. 1.	31. 1.	=	=	=	=	Neue Kulturen aus Reihe I und aus Rohmaterial hergestellte. Die aus Reihe I alle tot. Die andern noch lebend u. um Verunreinig. versammelt.
fortges.	bis 19. 2.	=	=	=	=	Die Resultate sind stets die gleichen.

Versuchsreihe V.

Kultur angesetzt	Kultur nachgesehen	Partiärdruck des H_2S in mm	Partiärdruck des O in mm	Partiärdruck der CO_2 in mm	Unterdruck durch H bis auf einige mm ausgegl. oder nicht	Zahl und Zustand der Kulturen
28.1.12	31. 1.	1,2	15	keine CO_2	ausgegl.	6 Kulturen, einige ohne fremde Organismen tot, verunreinigte lebend.
31. 1.	4. 2.	=	=	=	=	Die drei toten Kulturen ersetzt. Fäden in allen 6 Kulturen tot.
4. 2.	6. 2.	=	=	=	=	6 neue Kulturen mit Begg. u. Thiothr. In 4 Kult. alles tot. 2 mit Verunreinig. lebend.
6. 2.	9. 2.	0,8	=		=	Die 4 toten Kult. durch 8 reine ersetzt, diese wieder tot. Die 2 alten lebend.
9. 2.	13. 2.	=	=	=	=	Wieder neue Kulturen, jetzt auch die 2 alten tot.
13. 2.	15. 2.	=	=	25	=	9 neue reine Kulturen, diese gut.
15. 2.	18. 2.	=	=	=	=	Dgl.
18. 2.	20. 2.	=	=	=	=	Kultur. sehr gut, starke Vermehrung.
fortgef.	bis 6. 4.	=	=	=	=	Stets gleich gut lautende Notizen.

Für die eigenartigen Ergebnisse bei Reihe VII kann ich, wie bereits die Überschrift andeutet, keine andere Erklärung finden, als daß die farblosen Schwefelbakterien bei starkem Unterdruck zugrunde gehen.

Tabellen für die Kulturversuche in kohlensäurefreier Atmosphäre.

Für die hier in Betracht kommenden Untersuchungen wurden die mit No. IV, V und VIII bezeichneten Kulturreihen verwendet. Ich führe hier nur Tabellen für IV und V auf, da VIII nichts wesentlich neues bringen würde. Im übrigen verweise ich auf die im Anhang wiedergegebenen Protokolle.

III. Gewinnung der Reinkulturen.

Wie schon am Anfang des vorigen Kapitels angedeutet ist, bemühte ich mich vergeblich, mit den verschiedensten Verfahren eine Isolierung der Schwefelbakterien in Reinkulturen zu erzielen. Lange Zeit wurden diese Versuche als aussichtslos aufgegeben, bis sich die bei den bisherigen Untersuchungen angewendete Kulturmethode auch zur Erreichung dieses Zieles brauchbar erwies. Spezieskulturen zu erreichen, die in der Isolierung bestimmter Dickenformen von Beggiatoa und Thiothrix bestanden hätten, lag nicht in meiner Absicht, da es sich hier meist um physiologische Fragen handelte, die bei allen untersuchten Spezies die gleichen waren.

1. Reinkultur von Thiothrix.

Zunächst werde ich mich mit der Reinkultur von Thiothrix zu beschäftigen haben, da diese am ehesten gelang und auch weit einfacher war als die von Beggiatoa. Lange Zeit hatte ich nur die letzte der beiden genanten Schwefelbakterienformen in Kultur, bis dann plötzlich in einigen Schalen die für Thiothrix bezeichnenden Rasenbildungen auftraten, die sich bald über die ganze Schale ausbreiteten und dabei die Beggiatoen allmählich verdrängten. Nachdem genügend Material vorhanden war, so daß keine Gefahr bestand, alles zu verlieren, ging ich dazu über, die Kolonien von den sie verunreinigenden Lebewesen zu säubern. Zu diesem Zwecke brachte ich die Petrischale mit den Thiothrixkolonien ohne besondere Vorsichtsmaßregeln unter den Strahl der Wasserleitung und ließ diesen eine halbe Stunde lang sehr stark laufen. So waren mit ziemlicher Sicherheit alle in der Schale befindlichen Verunreinigungen weggespült. Darauf wurde die Kultur noch 2 bis 3 Mal mit sterilem Langenbrücker Wasser ausgespült und dann verschlossen. Der Deckel der Schale lag während der ganzen Zeit

auf einem mit Alkohol getränkten Stück Fließpapier, so daß durch ihn keine Infektion zu befürchten war. Unter dem Mikroskop zeigten die so behandelten Kulturen nur noch die Schleimpolster und ganz geringe Reste der ursprünglich sehr langen Thiothrixfäden. Diese recht grobe Behandlung beeinträchtigte nicht im geringsten die Lebensfähigkeit der Thiothrixkulturen. Nach ungefähr einer Woche hatten die Fäden wieder eine beträchtliche Länge erreicht und begannen in der zweiten Woche die Abschnürung von Endgliedern.

Mag dies Verfahren im Vergleich zu anderen bakteriologischen Reinzüchtungsverfahren recht wenig sicher und roh erscheinen, denn es war schwer, zu vermeiden, daß bei der mikroskopischen Kontrolle nicht doch einige fremde Sporen die Schale hätten infizieren können, so führte es doch zum Ziele. Sicher hat dabei die ganz ausschließlich den Bedürfnissen der Schwefelbakterien angepaßte Atmosphäre in den Kulturglocken die wesentliche Arbeit geleistet, da es wohl kaum, außer vielleicht einigen anderen Schwefelbakterien, Infusorien und Oscillarien, einen Organismus gibt, welcher auf die Dauer im Stande ist, ein solches Gasgemisch zu ertragen, oder gar darin lebens- und vermehrungsfähig zu bleiben. Es ist leicht möglich, obgleich ich es nie beobachtet habe, daß hineingekommene Bakterien- und Pilzsporen in dem ja nicht ungünstigen Langenbrücker Wasser eine kurze Zeit gelebt und einige Entwicklungsstadien durchlaufen haben, dann aber absterben mußten. Ich kann hier nur die Tatsache anführen, daß die Kulturen, nachdem sie mehrere Male in der oben beschriebenen Weise behandelt worden waren, absolute Reinheit zeigten. Denn setzte ich dem Langenbrücker Wasser 0,1—0,2% Pepton zu, so konnten die Schalen wochenlang in Kultur bleiben, ohne daß die geringste Spur einer Bakterienvermehrung bemerkbar gewesen wäre. Es wurden Proben mit Pepton und Fleischsaft nicht etwa ausschließlich unter den Glocken, sondern auch in reiner Luft wiederholt angestellt. Selbst Proben in Röhrchen auf Peptonagar, Pepton-Fleischsaftagar und Heydenagar zeigten nichts als die toten Thiothrixfäden, blieben aber sonst völlig rein, auch wenn sie bei 30° C. standen, so daß damit wohl der Beweis absoluter Reinheit erbracht ist.

2. Die Reinkultur von Beggiatoa.

Weniger leicht als die Reinkultur von Thiothrix gelang die von Beggiatoa. Zunächst wurden die zu benutzenden Petrischalen in heißer Luft sterlisiert und dann mit sterilem Langenbrücker Wasser gefüllt. Das Beggiatoamaterial wurde, bevor es in die Schalen kam, mit sterilem Langenbrücker Wasser tüchtig ausgewaschen, damit schon von vornherein die Verunreinigungen möglichst beseitigt waren. Dann brachte ich die Schalen in die günstigste Atmosphäre unter die Glocken

und erneute jeden zweiten Tag das Gasgemisch. Alle acht Tage wurde die Nährflüssigkeit gewechselt. In kurzer Zeit ließ sich dann eine deutliche Vermehrung der Beggiatoen feststellen. Die Fäden bewegten sich lebhaft und waren über die ganze Schale verbreitet, teilweise entstanden so dichte Schleier von Beggiatoa, daß man sie mit bloßem Auge erkennen konnte. In solchen Kulturen zeigte sich nach einiger Zeit ein feines Netz von Beggiatoafäden über die Flüssigkeitsoberfläche ausgespannt. Die Fäden benutzten die regelmäßig auf der Nährlösung schwimmenden Kristalle als Stützpunkte. Die schwimmenden Fäden zeigten selten Verunreinigungen, meist hielten sich die besonders lästigen Infusorien in der Tiefe der Flüssigkeit. Von diesem Material impfte ich dann in eine sterile Schale mit sterilem Langenbrücker Wasser über. Die dann noch mit übertragenen Infusorien fanden in der Flüssigkeit nur spärliche Nährstoffe. Da die Beggiatoen sehr gut gediehen, fand sich auch hier keine Nahrung für die Infusorien. Daß sie sich von absterbenden Beggiatoafäden ernähren, habe ich oft beobachten können, die lebenden Fäden waren aber zu widerstandsfähig, um von dem Strudel an der Cytostomöffnung weggerissen zu werden. So gelang es nach vier- bis fünfmaligem Weiterimpfen, Kulturen zu erhalten, die ausschließlich Beggiatoen enthielten. Die Proben, welche mit Pepton, Fleischsaft und den verschiedenen Agarmischungen angestellt wurden, verliefen genau in der gleichen Weise, wie ich es oben für Thiothrix beschrieben habe.

Somit war es gelungen, die beiden hauptsächlichsten Vertreter der farblosen Schwefelbakterien des Süßwassers zu isolieren. Danach muß es als erwiesen gelten, daß diese Schwefelbakterien sich autotroph ernähren können, wenn ihnen Schwefelwasserstoff, Sauerstoff, Kohlendioxyd und eine bestimmte mineralische Nährlösung zur Verfügung steht, wie es in den Schwefelquellen tatsächlich der Fall ist. Etwas anders liegen die Verhältnisse in Flüssen und Sümpfen, wo der Schwefelwasserstoff erst durch die Tätigkeit anderer Lebewesen aus den faulenden organischen Stoffen, oder aus sauerstoffhaltigen, anorganischen Schwefelverbindungen durch Reduktion entsteht. Diese Schwefelwasserstoffversorgung ist aber auch das einzige Abhängigkeitsverhältnis der Schwefelbakterien von anderen Organismen. An den beiden letztgenannten natürlichen Fundorten für Schwefelbakterien könnten von diesen schließlich auch organische Substanzen verarbeitet werden. Ob dies der Fall ist, wird im nächsten Abschnitt näher zu erläutern sein.

IV. Bestimmung der anorganischen und organischen Stoffe, welche zur Ernährung der Schwefelbakterien geeignet sind.

In dem bisher dargestellten Teil meiner Arbeit habe ich als Kulturflüssigkeit fast ausschließlich das Wasser der Langenbrücker Schwefelquelle (Waldquelle) verwendet. Die bei Winogradsky angegebene, von Bunsen ausgeführte Analyse dieses Wassers legte ich nun auch meinen weiteren Untersuchungen zugrunde. Ich werde daher der Einfachheit wegen die in Winogradskys Arbeit gemachten Angaben hier wiederholen: Das Wasser der Waldquelle hat in 1000 Teilen Flüssigkeit:

Zweifach kohlensauren Kalk	3,4055
Zweifach kohlensaure Magnesia	2,6503
Wasserfreien schwefelsauren Kalk	3,1478
Schwefelsaure Magnesia	5,0528
Schwefelsaures Natron	2,1245
„ Kali	0,2072
Phosphorsauren Kalk (dreibasisch in CO_2 gelöst)	0,2157
Chlorkalium	0,1358
Schwefeleisen (in Schwefelcalcium gelöst)	0,0459
Tonerde	0,0414
Schwefelcalcium	0,0569
Kieselerde	0,1753
freie Kohlensäure	2,3561
freien Schwefelwasserstoff	0,0994

Spuren von organischen Stoffen und von Fluorcalcium.

Zunächst versuchte ich diese sehr zusammengesetzte Flüssigkeit durch einfachere zu ersetzen und verwendete zuerst Knopsche, Sachssche und allerdings nur kurze Zeit auch v. d. Cronesche Nährlösung; in alle leitete ich, ehe Schwefelbakterien hineingeimpft wurden, etwas CO_2. Leider waren die Ergebnisse nicht günstig, in kurzer Zeit waren alle Beggiatoa- bezw. Thiothrixfäden tot. Auch alte Kulturen, in denen das natürliche Langenbrücker Wasser durch eine dieser Lösungen ersetzt wurde, gingen bald zugrunde. Vielleicht waren diese Flüssigkeiten wegen ihrer schwach sauren Reaktion ungeeignet.

Ich stellte darauf mehrere Lösungen zusammen, die vielleicht den Bedürfnissen der Schwefelbakterien besser entsprechen konnten. So z. B.

NaH_2PO_4 Natriumorthophosphat, Mononatriumphosphat } 0,1 %

$MgSO_4$	Magnesiumsulfat	0,05%
KCl	Chlorkalium	0,05%
$KHCO_3$	Kaliumbikarbonat	0,1 %

und dazu entweder KNO_3 Kaliumnitrat oder $(NH_4)_2SO_4$ Ammoniumsultat.

Weiter wurde zu hiesigem Leitungswasser, welches ziemlich reich an Calciumsalzen ist, noch Ammoniumphosphat $(NH_4)_2HPO_4$, Kaliumnitrat (KNO_3) oder Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$ gesetzt. Schließlich verwendete ich auch noch folgende Lösung:

Magnesiumsulfat	$(MgSO_4)$	0,5 %
Kaliumbikarbonat	$(KHCO_3)$	0,5 %
Tricalciumphosphat	$(Ca_3(PO_4)_2)$	0,02%
Calciumnitrat	$(Ca(NO_3)_2)$	0,01%

und dann die gleiche Lösung, nur Ammoniumsulfat $(NH_4)_2SO_4$ statt Calciumnitrat $(Co(NO_3)_2)$

Spuren von Schwefelkalium (K_2S) und Schwefeleisen (FeS).

Auch diese Lösungen führten bei Beggiatoa zu keinem positiven Ergebnis. — Ob die Beggiatoen nicht im Stande sind, starke Änderungen des osmotischen Druckes der sie umgebenden Flüssigkeit zu ertragen, oder ob die Reaktion der Lösung eine große Rolle spielt, habe ich nicht entscheiden können. Durch weiter unten zu beschreibende Versuche mit organischen Stoffen wird sogar ziemlich wahrscheinlich gemacht, daß der osmotische Druck nicht allzu erheblich wirkt. — Die Beggiatoafäden zerfielen auch hier sehr bald in kleine Stückchen, die völlig unbeweglich waren. Nur schneller Zusatz natürlichen Langenbrücker Wassers ermöglichte es, die Kulturen zu retten und zu neuem Wachstum anzuregen.

Da diese Versuche, mit einer einfachen Nährflüssigkeit zu arbeiten, fast ausnahmslos scheiterten, sah ich mich veranlaßt, eine dem Langenbrücker Wasser möglichst entsprechende Nährlösung herzustellen, die ich als „künstliches Langenbrücker Wasser“ bezeichnen will. Ich lehnte mich dabei zunächst ziemlich eng an die Analyse von Bunsen an. Später wurden, um den Wert der einzelnen Salze zu studieren, einige Veränderuugen vorgenommen. Meist befanden sich in der Flüssigkeit:

Calciumbikarbonat $CaH_2(CO_3)_2$	0,34%
Magnesiumbikarbonat $MgH_2(CO_3)_2$	0,27%
Calciumsulfat $(CaSO_4)$	0,31%
Magnesiumsulfat $(MgSO_4)$	0,51%
Natriumsulfat (Na_2SO_4)	0,21%
Kaliumsulfat (K_2SO_4)	0,02%
Calciumphosphat $(Ca_3(PO_4)_2)$	0,02%
Kaliumchlorid (KCl)	0,01%
Kaliumsulfid (K_2S)	0,01%
Eisensulfid (FeS)	0,01%
Calciumsulfid (CaS)	0,01%

Dazu wurden dann noch verschiedene stickstoffhaltige Verbindungen gebracht. Da sich die Frage nach der Wirkung der einzelnen Salze nicht ohne Anwesenheit von bestimmten stickstoffhaltigen Substanzen lösen läßt, fand zunächst die Bestimmung der

Stickstoffquellen für die Schwefelbakterien

statt. Nachdem ich einige Kulturen mit dem künstlichen Langenbrücker Wasser ohne Zusatz einer Stickstoffverbindung angesetzt und damit keine Erfolge gehabt hatte, wandte ich mich der Frage zu, ob Nitrate, Ammoniumsalze oder organische Stickstoffverbindungen verarbeitet werden können. So wurden dem künstlichen Langenbrücker Wasser 0,05% Calciumnitrat zugesetzt. Damit ließ sich wohl die Lebensdauer bei Beggiatoa und Thiothrix etwas verlängern, doch gelang es nie, eine merkliche Vermehrung festzustellen. Die Bewegungen der Beggiatoafäden waren sehr langsam, und bei Thiothrix fand keine Abschnürung von Fortpflanzungszellen statt.

So wandte ich mich zur zweiten Gruppe stickstoffhaltiger Substanzen, den Ammoniumverbindungen, um zu sehen, wie sie auf die Ernährung der farblosen Schwefelbakterien einwirken. Zunächst zeigten auch hierbei die Kulturen kein besonders gutes Aussehen, kurz nach dem Ersetzen des natürlichen Wassers durch künstliches mit Ammoniumsulfat gingen die meisten Beggiatoafäden zugrunde, so daß diese Stickstoffquelle nicht die richtige zu sein schien. Die Kulturen wurden jedoch noch einige Zeit in der günstigsten Atmosphäre gehalten und mit frischem künstlichen Wasser mit $(NH_4)_2SO_4$ versehen. Nach ungefähr einer Woche zeigten diese Kulturen ein ganz anderes Verhalten. Die wenigen am Leben gebliebenen Fäden, welche sich inzwischen den neuen Verhältnissen angepaßt haben mochten, begannen sich lebhaft zu bewegen und stark zu vermehren. Die Vermehrung ging recht schnell vor sich, so daß die Kulturen mit $(NH_4)_2SO_4$ bald die mit natürlichem Schwefelwasser ohne Ammoniumsalz an Schönheit übertrafen.

An dieser Stelle soll auch das Verhalten einiger Thiothrix-Kulturen bei Zusatz der oben angeführten vereinfachten Nährlösungen — es handelte sich um die beiden auf S. 19 beschriebenen — eingehender besprochen werden. Wie betont, schlugen alle Versuche mit diesen Lösungen bei Beggiatoen fehl, bei Thiothrix dagegen gelang die Kultur in der Lösung mit $(NH_4)_2SO_4$. Während in der Flüssigkeit mit $(CaNO_3)_2$ alle Fäden allmählich abstarben, gediehen sie mit Ammoniumsulfat recht gut, die Fäden wuchsen lang aus und zeigten an den Enden oft drei und mehr abgeschnürte Fortpflanzungszellen. Dieses gegen Beggiatoa so abweichende Verhalten der Thiothrix mag wohl seinen Grund in der größeren Widerstandsfähigkeit und Bedürfnislosigkeit der letzteren haben.

Jedenfalls ist durch diese Untersuchungen festgestellt, daß Ammoniumsalze als Stickstoffquelle anorganischen Ursprungs[1]) bei dem Wachstum der farblosen Schwefelbakterien allein in Betracht kommen.

Nachdem so in dem künstlichen Langenbrücker Wasser mit einem Zusatz von 0,05% $(NH_4)_2SO_4$ eine vorzügliche Nährlösung gefunden war, wandte ich mich zur Untersuchung der Wirkung einiger anderer in der Lösung vorhandener Salze zu. Dabei stellte sich heraus, daß die Anwesenheit von Carbonaten der Alkalierdmetalle unbedingt notwendig ist. Es war ziemlich gleichgültig, ob Magnesium- oder Calciumsalze Verwendung fanden. Ungeeignet zum Ersatz der Salze der alkalischen Erden waren die Salze der Alkalien. Als ziemlich förderlich erwies sich die Anwesenheit eines Chlorids in der Lösung. Selbstverständlich durften phosphorhaltige Stoffe nie fehlen.

Um nun ganz sicher behaupten zu können, die farblosen Schwefelbakterien bedürfen zu ihrer Ernährung keiner organischen Stoffe, verfuhr ich folgendermaßen: Die Petrischalen und sonstigen Glasgefäße, welche bei diesem Teil der Arbeit Verwendung fanden, wurden mit einer Lösung von Chromsäure in Schwefelsäure ausgewaschen, mit destilliertem Wasser ausgespült und sterilisiert. Dann wurde eine aufs sauberste hergestellte, künstliche Nährlösung mit $(NH_4)_2SO_4$ in die Schalen gebracht und aus Reinkulturen Thiothrix, bezw. Beggiatoa hineingeimpft. So hatte ich die Gewähr, in den Kulturen jede Spur organischer Nährstoffe ausgeschaltet zu haben. Die wenigen übergeimpften Fäden vermehrten sich bald sehr stark, auffallend war bei Beggiatoa die außerordentliche Länge der Fäden.

Zur Bestätigung der in diesem Abschnitt dargestellten Untersuchungen möchte ich nun noch einige Angaben aus meinen Protokollen wiedergeben. Ehe ich dies jedoch tue, weise ich nochmals darauf hin, daß man kurze Zeit nach dem Überführen aus natürlichen in künstliches Langenbrücker Wasser nie sehr schöne Kulturen erwarten darf.

Versuche mit den beiden künstlichen Nährlösungen (s. S. 19).
Stickstoffquelle $Ca(NO_3)_2$.

12. 2. 12. 8 Schalen mit Beggiatoa, teils mit Thiothrix auf mehrere Kulturglocken verteilt.
15. 2. 12. Alle Beggiatoenkulturen schlecht. Thiothrixkulturen besser. Die toten Beggiatoakulturen durch neue ersetzt.
18. 2. 12. Alle 8 Kulturen, auch die von Thiothrix, tot. Noch einmal 8 neue Kulturen.
21. 2. 12. Beggiatoa tot, Thiothrix schlecht in allen Kulturen.

---

[1]) Einige weitere Bestätigungen werden die Versuche mit organischen Stoffen bringen.

Von nun an: Stickstoffquelle $(NH_4)_2SO_4$.

21. 2. 4 Kulturen mit Beggiatoa, 4 mit Thiothrix.

23. 2. Die Beggiatoenkulturen wieder tot.
Thiothrixkulturen leidlich. Neue Beggiatoenkulturen.

25. 2. Thiothrixkulturen gut. Beggiatoa tot.

fortgeführt bis 15. 3., stets dieselben Erfahrungen.

Versuche mit künstlichem Langenbrücker Wasser.

Stickstoffquelle: $Ca(NO_3)_2$.

(Die Kulturschalen waren stets auf mehrere Glocken verteilt.)

2. 3. 12. 8 sehr gute Beggiatoa- und Thiothrixkulturen verwendet.

5. 3. Alle Kulturen sehen leidlich aus.

7. 3. Desgl.

9. 3. Beggiatoakulturen schlecht. Thiothrix leidlich.

12. 3. Alle 8 Kulturen tot.
Nochmals 8 neue Kulturen, wie am 2. 3.

15. 3. Die Kulturen sehen nicht schlecht aus.

18. 3. Beggiatoakulturen zeigen Zerfall der Fäden.
Thiothrixkulturen leidlich.

20. 3. Alle 8 Kulturen zeigen nur tote Fäden.
NB. Noch mehrere Male mit gleichem Erfolg wiederholt.

Stickstoffquelle: $(NH_4)_2SO_4$.

2. 3. 12. 8 sehr gute Beggiatoen- und Thiothrixkulturen verwendet.

5. 3. Viele Beggiatoafäden tot, die anderen kriechen nur langsam.
Thiothrixkulturen leidlich.

7. 3. Desgl. Noch einige neue Beggiatoakulturen.

9. 3. Thiothrixkulturen leidlich. Die Beggiatoafäden bewegen sich lebhafter. Die am 7. hinzugekommenen sehen nicht gut aus.

12. 3. Die 8 alten Kulturen sehen sehr gut aus. Die vom 7. nicht besonders.

15. 3. Alle 12 Kulturen sind gut.

18. 3. Überall lebhafte Vermehrung, die Kulturen sehr gut aus, besser sogar als die Parallelkulturen mit natürlichem Langenbrücker Wasser.

20. 3. Desgl.

Notizen lauten stets sehr gut bis zur Beendigung der Versuche.

Nach diesen Versuchen kann man mit Bestimmtheit sagen, daß Ammonsalz in erster Linie als Stickstoffquelle für die farblosen Schwefelbakterien in Betracht kommen. Ich möchte sogar behaupten, daß das lebhaftere Wachstum in dem $(NH_4)_2SO_4$ haltigen, künstlichen Langenbrücker Wasser, gegenüber dem der Kulturen in natürlichem Schwefelwasser ausschließlich auf den größeren Vorrat leicht assimilierbaren Stickstoffes zu schieben ist. Diese Ansicht wird durch

die im folgenden Abschnitt zu besprechenden Untersuchungen mit organischen Stoffen noch weitere Bestätigung finden.

Mit den vorliegenden Untersuchungen ist jedenfalls einwandfrei festgestellt, daß wir in den farblosen Schwefelbakterien rein autotrophe Lebewesen vor uns haben, die zum Aufbau ihrer Zellkörper weder der Hilfe anderer Organismen noch organischer Stoffe bedürfen. „Damit erklärt sich auch", wie Omelianski[1]) im Anschluß an eine Vermutung, daß die Schwefelbakterien autotrophe Lebewesen sind, sagt, „einerseits ihr (im Verhältnis zur Größe der Schwefelabspaltung) ungemein langsames Wachstum, andererseits ihre Unfähigkeit, auf den in der Bakteriologie gewöhnlich gebräuchlichen Nährboden zu gedeihen."

Nach obiger Feststellung ist es von Interesse zu sehen, wie organische Stoffe auf die Schwefelbakterien einwirken.

Die Wirkung organischer Stoffe auf die farblosen Schwefelbakterien.

Nachdem im vorigen Abschnitt bewiesen worden ist, daß eine Ernährung der Schwefelbakterien mit organischen Stoffen nicht notwendig ist, sollen hier verschiedene Stoffe organischen Ursprungs in ihrer Wirkung auf die farblosen Schwefelbakterien besprochen worden. Schon Winogradsky hat versucht, die Beggiatoen in künstlichen, leicht zersetzliche Stoffe enthaltenden Nährlösungen zu kultivieren, aber ohne jeden Erfolg. Ich will, ehe ich meine Beobachtungen wiedergebe, die wichtigsten Punkte der Winogradskyschen Darlegungen, der besseren Orientierung halber, wiederholen. Er schreibt:

„Ich habe sehr verschiedene Stoffe angewendet und in allen möglichen Konzentrationen. Mit sehr verdünnten Lösungen erhielt ich etwas bessere Resultate als mit etwas konzentrierteren. Kultiviert man Beggiatoa in einer Lösung von $^1/_2$% Pepton und 1% Zucker, so wimmelt schon nach 15—20 Stunden die Kultur von Bakterien; . . . . . Ich habe folgende Reihe von ungefähr gleich verdünnten Nährlösungen gebraucht. 1. Pepton. 2. Pepton und Zucker. 3. Zucker und Ammonnitrat. 4. Zucker und Ammontartrat. 5. Asparagin allein. 6. Asparagin und Ammontartrat, dann noch einige Dekokte und Nährgelatine. Diese Substanzen löste ich in Brunnenwasser oder Langenbrücker Wasser. Ich beschränke mich auf einige kurze Bemerkungen. In zucker- und peptonhaltigen Lösungen traten, trotz wiederholtem Auswaschen der Kulturen, Bakterien bald masaenhaft auf, was (d. h. wahrscheinlich die gebildeten Zersetzungsprodukte) nachteilige Folgen für die Beggiatoen hatte. Die Kulturen gingen bald zugrunde . . . . . — Das einzige Ergebnis aller dieser Versuche war, daß Beggiatoen in den genannten Lösungen viel schlechter gedeihen, als im Wasser der Schwefelquellen. Der Zusatz von diesen leicht zersetzbaren Stoffen ist also für das Gedeihen der Beggiatoen zum mindesten unnötig. Im Gegenteil scheint die Anwesenheit dieser Stoffe ihr Wachstum zu hemmen. Das hat freilich seinen Grund in erster Linie in dem Umstande, daß diese Stoffe die Vermehrung der Bakterien begünstigen, welche für die

[1]) Lafar, Handbuch der technischen Mykologie.

Beggiatoen schädliche Zersetzungsprodukte bilden. Ich habe aber auch manchmal eine ganz deutliche Hemmung des Wachstums in Lösungen, wo Bakterien nur langsam sich vermehrten, beobachtet . . . . . Diese Beobachtungen scheinen auf eine direkte nachteilige Wirkung dieser oben genannten organischen Stoffe hinzuweisen; worin dieselbe besteht, ist unklar, vielleicht nur in der Erhöhung der Konzentration, der osmotischen Wirkung der Flüssigkeit. Schließlich läßt sich diese direkte nachteilige Wirkung doch nicht ganz sicher beweisen infolge des unvermeidlichen, aber wechselnden Eingreifens von verschiedenen Bakterien. — Als sicher kann man nur folgenden Satz betrachten, daß die Beggiatoen auch in der Natur die leicht gährenden Substanzen nicht benutzen können, weil sie in einer solche Substanzen enthaltenden Lösung die Konkurrenz mit anderen Bakterien nicht aushalten können."

Diese Betrachtungen Winogradskys lieferten den Ausgangspunkt für meine Untersuchungen. Nach den Erörterungen Winogradskys ist es vollkommen klar, daß zu einer befriedigenden Lösung dieser Fragen die Ausschaltung jedes die Übersicht störenden fremden Organismus Notwendigkeit war. So kamen mir für diesen Teil meiner Arbeit besonders die Reinkulturen sehr zustatten und ermöglichten auch hier die Lösung der in Betracht kommenden Fragen. Es fanden hauptsächlich die von Winogradsky angegebenen sechs Lösungen Verwendung. 1. Pepton, 2. Pepton und Zucker, 3. Zucker und Ammonnitrat, 4. Zucker und Ammontartrat, 5. Asparagin allein, 6. Asparagin und Ammontartrat. Vondiesen Stoffen wurden konzentrierte Lösungen von bestimmtem Prozentgehalt hergestellt und dann eine abgemessene Menge davon den sterilen Nährflüssigkeiten zugesetzt. Ich habe dabei Konzentrationen gegeben, die mindestens 0,1%, höchstens 0,5% organischer Substanz enthielten. Höhere Konzentrationen verwendete ich nur einige Male, es traten jedesmal Erkrankungserscheinungen auf. Was deren Ursache betrifft, so möchte ich mich hier der Ansicht Winogradskys anschließen, welcher den erhöhten osmotischen Druck als Ursache der Erkrankungserscheinungen betrachtet. Wie ich jedoch schon weiter oben andeutete, können hier auch die Reaktion der Nährlösung und andere bisher unbekannte Einflüsse mitwirken.

Die Kulturversuche mit allen sechs angegebenen Lösungen verliefen recht befriedigend insofern, als sich in keiner Petrischale vom 14. März bis Ende April auch nur eine Spur fremder Organismen zeigte, worin eine Bestätigung des Gelingens der Reinkultur liegt.

Andererseits bestätigte sich Winogradskys Vermutung von der Schädlichkeit organischer Stoffe nicht im geringsten. Die Schwefelbakterien zeigten den ihnen gebotenen organischen Substanzen gegenüber ein völlig gleichgültiges Verhalten in bezug auf Wachstum und Vermehrung. Eine Steigerung der Lebenstätigkeit bewirkten die Lösungen, welche Ammonverbindungen enthielten. (Als Nährflüssigkeit diente natürliches Langenbrücker Wasser, welches ja bekanntlich sehr

arm an Stickstoff ist.) Dies fällt aber bei der Bevorzugung der Ammonsalze als Stickstoffnahrung für Beggiatoa und Thiothrix nicht weiter auf. Die schädigende Wirkung der organischen Stoffe blieb vollkommen aus. Nirgends traten Zerfallerscheinungen auf, weder, wie bei Winogradsky nach 24 Stunden, noch nach mehrwöchentlicher Kulturdauer. Die Vermehrung und alle anderen Lebensvorgänge liefen genau so schnell ab, wie in den Parallelkulturen mit rein anorganischem Nährsubstrat, bezw. natürlichem Langenbrücker Wasser. Diese Lösung der Frage entspricht wohl auch am besten den Bedingungen, unter welchen die Schwefelbakterien in der Natur meist vorkommen. Hiermit sind weniger die Schwefelquellen gemeint, deren Wasser wohl immer nur Spuren organischer Substanzen enthält, sondern Flüsse und Sümpfe, die da, wo Schwefelwasserstoff entwickelt wird, doch stets organische Substanzen enthalten.

Auf Grund der Winogradskyschen und meiner Beobachtungen habe ich mich nicht weiter bemüht zu untersuchen, ob organische Stoffe einen Ersatz für den Schwefelwasserstoff bilden können. Denn läßt man eine Reinkultur mit künstlichem Wasser, $(NH_4)_2SO_4$ und organischen Stoffen einige Zeit in frischer Luft stehen, so verschwindet allmählich aller Schwefel aus den Zellen und nach kurzer Zeit zerfallen die Fäden. Damit ist doch wohl bewiesen, daß Schwefelwasserstoff nicht durch organische Substanzen ersetzt werden kann. Wenn Winogradsky in peptonhaltigen Flüssigkeiten eine Schwefelausscheidung in den Beggiatoafäden fand, so war der dazu notwendige Schwefelwasserstoff eben durch die Tätigkeit fremder Bakterien frei geworden und konnte so von den Beggiatoen oxydiert werden. Die farblosen Schwefelbakterien sind nicht imstande, sich aus anderen Stoffen selbst Schwefelwasserstoff zu erzeugen, oder unter Aufhebung der Schwefelwasserstoffoxydation organische Stoffe zu verarbeiten, sich also heterotroph zu ernähren, wie dies die Wasserstoffbakterien vermögen.

Nachdem so die Notwendigkeit des Schwefelwasserstoffes festgestellt ist, bleibt noch die Frage, ob organische Stoffe für die Kohlensäure und die Ammoniumsalze einen Ersatz bilden können. Für die Experimente über die Ersetzbarkeit des Kohlendioxyds wandte ich das auf S. 10 beschriebene Verfahren an, wobei allerdings nur die Glocken bis auf eine zehntel Atmosphäre ausgepumpt wurden. Der dabei zurückbleibende Rest Kohlensäure genügt, wie gezeigt, nicht zur Ernährung. Der Schwefelwasserstoff wurde mit Wasserstoff gemischt in die Glocken gebracht. Da Reinkulturen in künstlichem Langenbrücker Wasser bei diesen Versuchen verwendet wurden, war eine CO_2-Abgabe von Seiten der Flüssigkeit, wie es bei natürlichem Wasser geschieht, ausgeschlossen. Trotzdem Pepton, Zucker und andere kohlenstoffreiche organische Substanzen zur Nährflüssigkeit gesetzt worden waren, zeigten die Kulturen bereits nach zwei Tagen viele, nach drei Tagen ausnahmslos tote

Fäden. Es gelang auch nicht durch Überführen der Kulturen in normale, d. h. kohlensäurehaltige Atmosphäre die Schwefelbakterien Beggiatoa und Thiothrix zu neuem Wachstum anzuregen.

Nun bleibt nur noch die Frage, ob an Stelle der Ammoniumsalze organische Stickstoffverbindungen treten können. (Organische Ammonsalze wirkten, wie ja oben erwähnt wurde, auch etwas fördernd.) Eingehender habe ich mich mit der Wirkung von Asparagin, Leucin und Pepton beschäftigt, die ja im allgemeinen recht gute Stickstoffquellen für Bakterien sind. Während nun die Kontrollversuche mit künstlichem Wasser und Ammoniumsulfat sehr schöne Beggiatoa- und Thiothrixkulturen lieferten, traten in den Kulturen, in welchen als Stickstoffquelle Pepton, Asparagin oder Leucin gegeben war, nach 6—10 Tagen Erkrankungserscheinungen auf, die bei unveränderten Kulturbedingungen bei Beggiatoa bald, bei Thiothrix nach ungefähr 20 Tagen zu völligem Absterben führten. Vorher war es leicht, durch Zusatz normaler, d. i. $(NH_4)_2SO_4$-haltiger Nährflüssigkeit die Kulturen zu erhalten und auf ihr ursprünglich gutes Aussehen und Wachstum zurückzuführen. Ob nicht andere Stickstoffquellen möglich sind, wurde nicht untersucht. Die sonst besten jedenfalls gingen nicht.

Hiermit kann man wohl die wesentlichen Probleme aus der Ernährungsphysiologie der farblosen Schwefelbakterien für gelöst ansehen. Es bleiben nur noch einige mit der Ernährungsphysiologie weniger eng verknüpfte Fragen und einige ökologische und morphologische Beobachtungen über die Schwefelbakterien zu besprechen.

Einfluß der Temperatur auf das Wachstum der farblosen Schwefelbakterien.

In der Literatur habe ich nur wenige Angaben über den Einfluß der Temperatur auf die Lebenserscheinungen der Schwefelbakterien gefunden. Aus der ersten Hälfte vorigen Jahrhunderts finden sich Angaben[1]), daß Beggiatoen in den Thermen von Euganea bei nahezu 70° vorkommen, neuere Untersuchungen[2]) scheinen zu beweisen, daß sie keine so hohen Temperaturen ertragen können.

Schon bei Besprechung der natürlichen Fundorte für Schwefelbakterien (s. S. 4) hatte ich Gelegenheit zu erwähnen, daß ich Beggiatoa und Thiothrix selbst bei einer Wassertemperatur von 0° noch in ziemlichen Mengen fand. Untersuchungen bei noch tiefer liegenden Temperaturen hielt ich für zwecklos. Meine Versuche im Laboratorium habe ich zunächst bei Temperaturen ausgeführt, welche zwischen 6° C. und 25° C. schwankten. Hierbei stellte sich das bemerkenswerte Ergebnis heraus, daß innerhalb dieser Grenzen weniger die Temperatur,

[1]) Comte Victor Trevisan, Prospetto della Flore Euganea.
[2]) Löwenstein 1903. Ber. bot. Ges. 21. 317.

als die Anwesenheit genügender Schwefelwasserstoffmengen der für das Wachstum wichtigste Faktor war. Es war wohl ein Unterschied zu bemerken, wenn eine Glocke bei 6° im ungeheizten Gewächshaus stand und die andere Glocke bei 20° im geheizten Arbeitsraum. Aber die Verschiedenheiten waren bei diesem Intervall doch recht unbedeutend. Auch ein öfteres Erneuern des Gasgemisches bei Temperaturen unter 20° brachte keine wesentliche Steigerung der Lebenstätigkeit.

Um nun Untersuchungen bei höheren Wärmegraden anzustellen, setzte ich in mehreren Glocken an Stelle des Glasrohres einen zweiten Glashahn, damit die Monometer leicht zu entfernen waren und nicht bei dem Hineinbringen in den Thermostaten hinderten. Das Gasgemisch wurde dann genau in derselben Zusammensetzung gegeben wie bisher, nur war es hier nötig, dasselbe öfters zu erneuern, da sich bei Temperaturen über 25° eine beträchtliche Steigerung der Lebenstätigkeit bemerkbar machte. Diese Steigerung des Wachstums und der Vermehrung hielt bei beiden Formen bis 30° an, darüber hinaus aber nicht weiter. Oberhalb von 35° ließ Thiothrix plötzlich nach, bei 37°—38° trat schon der Tod ein. Beggiatoa vertrug noch ganz gut 40—41°, erst bei 45° trat Zerfall der Fäden und schnelles Absterben ein. Nach den Beobachtungen, welche ich an Beggiatoakulturen gemacht habe, die längere Zeit nahe der oberen Grenze gehalten waren, ist es sehr wahrscheinlich, daß es keine allzu lange Zeit erfordern würde, die Temperaturgrenze durch Gewöhnung noch weiter nach oben zu verschieben, denn es trat nach einiger Zeit wieder lebhaftere Vermehrung auf. Genauer habe ich diese Frage nicht untersucht.

Ehe ich in der Wiedergabe meiner Beobachtungen weiter fortfahre, will ich etwas eingehender besprechen, in welcher Weise ich bei allen meinen Untersuchungen ein Maß für die Schnelligkeit des Ablaufs der Lebensvorgänge hatte. Es kommen dafür besonders die Vermehrung der Bakterienfäden und die Geschwindigkeit der Bewegung in Betracht. In ganz jungen Kulturen kann man oft durch Auszählen die Vermehrung feststellen. Jedoch ist es auch sonst, wenn man die Kulturen meist täglich, mindestens aber jeden zweiten Tag in Händen hat, leicht, festzustellen, ob eine Vermehrung stattgefunden hat oder nicht. Man sieht mit einiger Übung sofort, ob bei gleichem Ausgangsmaterial auf den unter dem Mikroskop beobachteten Stellen ungefähr die gleiche Zahl der Fäden vorhanden ist. In alten Kulturen bilden sich sehr oft kreisförmige Kolonien, die sich, vorausgesetzt, daß die Bedingungen andauernd gute sind, dann von Tag zu Tag vergrößern. Es kommen aber auch Wachstumsbilder vor, welche sehr lebhaft an die Schleier der Beggiatoen in Rohkulturen erinnern. Der ganze Boden der Petrischale ist dann von einem dichten Geflecht von Beggiatoafäden überzogen, aus welchem ganz regelmäßig dicke Faden-

büschel in die Flüssigkeit ragen. Daß es sich in solchen Kulturen um lebhafte Vermehrung handelt, unterliegt wohl keinem Zweifel, wenn man bedenkt, daß als Ausgangsmaterial ein winziges Flöckchen Beggiatoa verwendet worden war. Bei Thiothrix war auch in bezug auf die Vermehrung die Beobachtung wesentlich einfacher. Es konnte leicht eine dünn bewachsene Stelle bezeichnet werden, zuweilen auch eine Skizze davon entworfen werden. Bei jeder Kontrolle fand man dann bequem die Stelle wieder und konnte durch Vergleiche die Vermehrung feststellen. Es war dann zu sehen, wie die Fäden zunächst in die Länge wuchsen und dann durch Abschnürung von Gliedern die Fläche immer dichter bedeckten.

Einen Einfluß des Lichtes auf das Wachstum der farblosen Schwefelbakterien habe ich nie beobachten können, die Kulturen bei Licht wie bei Dunkelheit waren stets gleich gut. Auch die von Winogradsky beschriebenen phototaktischen Bewegungen der Beggiatoafäden habe ich nicht gesehen. Dies mag seinen Grund darin haben, daß trotz sonstiger großer Übereinstimmung einzelne Beggiatoaarten einige abweichende Eigenschaften haben. Zum Schluß mögen hier noch einige morphologische und entwicklungsgeschichtliche Beobachtungen wiedergegeben werden, welche allerdings zur Physiologie kaum nähere Beziehungen haben, mir aber doch der Mitteilung wert scheinen.

V. Einige morphologische und entwicklungsgeschichtliche Beobachtungen.

In seiner Abhandlung zur Morphologie und Physiologie der Schwefelbakterien beschreibt Winogradsky Beggiatoa wie folgt: „Zur Gattung Beggiatoa rechne ich ausschließlich farblose, scheidenlose, immer frei bewegliche, nie am Substrate befestigte Fäden sehr verschiedener Dicke.“ In allen Büchern, welche sich mit der Systematik der Schwefelbakterien befassen, findet man diese Angaben wiederholt, besonders auf die Scheidenlosigkeit wird ziemliches Gewicht gelegt. Ich hatte nun bei meinen Versuchen, einzelne Fäden von Beggiatoa zu isolieren, Gelegenheit zu beobachten, daß die Beggiatoen ebenso wie die Oscillarien eine Gallertscheibe besitzen. Die Fäden, bei denen die Absonderung gelungen war, starben jedesmal in kurzer Zeit ab, und es war dann deutlich zu sehen, wie genau in der Form des Fadens eine zarte Scheide lag, während die Zellen mit ihrem Schwefelkügelcheninhalt[1]) außerhalb lagen, also die zarte Hülle ge-

[1]) Eine Speicherung von Schwefel in den Zellen der Oscillarien habe ich nie beobachten können. Sicher ist aber, daß sie bei Anwesenheit von Licht in einer schwefelwasserstoffhaltigen Atmosphäre beliebig lange leben können. Vergl. hierzu: Lafar, Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 1, S. 129.

sprengt hatten. Somit wäre wohl ein weiteres Trennungsmerkmal zwischen den Beggiatoen und Oscillarien gefallen, denn abgesehen von dem Gehalt an Schwefeltröpfchen und der Farblosigkeit der Beggiatoen gleichen diese den Oscillarien bis ins Kleinste.

Meine Versuche, tiefer in den Mechanismus der eigentümlichen Bewegungsart von Beggiatoa einzudringen, führten zu keinem befriedigenden Resultate. Trotzdem will ich die darauf bezüglichen Beobachtungen hier wiedergeben. Die Enden des Fadens sind stets leicht umgebogen, genau wie bei Oscillaria. Kriecht nun der Beggiatoafaden vorwärts, so kann man sehen, wie er sich um seine Längsachse dreht, und zwar im entgegengesetzten Sinne des Uhrzeigers. Trifft der Faden auf einen Widerstand, so kehrt er einfach die Bewegungsrichtung um, das andere Ende geht voran, wobei wieder der gleiche Sinn der Drehung um die Achse eingehalten wird. Bei den unzähligen von mir beobachteten Fäden habe ich nie eine Linksdrehung festgestellt. Interessant waren auch die Bewegungen der Fäden in etwas zäheren Medien, z. B. ½prozentigem Agar. Es schob sich dabei nicht ein Fadenende mit der Spitze durch die Agarschicht, sondern die Mitte des Fadens wurde nach vorn gedrückt, indem die beiden Enden den ganzen Faden fortzuschrauben schienen. Diese Art des Durchdrückens habe ich übrigens nur bei der dicksten (4 μ) der von mir kultivierten Beggiatoaformen beobachtet.

Endlich muß ich noch einige Untersuchungen über Thiothrix mitteilen. Da ich über sehr gutes Thiothrixmaterial verfügte, interessierte es mich, an ihm einmal die von Winogradsky beschriebene[1]), komplizierte Art der Fortpflanzung bei dieser Bakterienform zu beobachten. Wohl gelang es leicht in einer Kultur, welche massenhaft Thiothrix enthielt, eine Stelle zu finden, an der die Fäden die von Winogradsky beschriebenen Abschnürungen der Endglieder zeigten. Ich habe solche Stellen dann stundenlang, oft tagelang unter fortwährender mikroskopischer Beobachtung gehabt. Damit Erschütterungen vermieden waren, stand das Mikroskop auf einer in die Wand eingemauerten Schieferplatte. Nicht einmal war es mir vergönnt, die interessante aktive Loslösung der Endglieder zu beobachten. Eine Ablösung fand wohl statt, nach welcher sich die Stäbchen mit einer Gallertscheibe an das Glas anhefteten, aber von einer Eigenbewegung bei diesen Vorgängen war nichts zu bemerken. Ich bin nicht ganz im klaren, welche Fehler meiner Versuchsanordnung zugrunde gelegen haben könnten. Möglich wäre es jedoch, daß die Thiothrixarten sich in bezug auf die Fortpflanzung verschieden verhalten.

Meine sonstigen Beobachtungen über die Morphologie von Thiothrix

---

[1]) cf. S. 1. 3, II.

stimmen vollkommen mit denen von Winogradsky überein. Ja ich kann sogar die von verschiedenen Seiten gemachten Versuche, zu beweisen, daß die dunklen stark lichtbrechenden Körnchen in den Zellen Gasvacuolen oder sonstige Stoffe seien, nicht aber Schwefel, wie Winogradsky angibt, widerlegen. Es handelt sich hierbei um zwei Arbeiten, eine von Wille[1]) und eine von Molisch[2]). Ersterer führt zum Beweis der Gasnatur der Kügelchen folgende Tatsachen auf:

1. die optischen Verhältnisse, welche mit Bestimmtheit auf Gasbläschen hindeuten;
2. daß die Gasvacuolen bei Erwärmung bei einer Temperatur verschwinden, die bedeutend niedriger liegt, als der Schmelzpunkt des Schwefels;
3. daß mehrere naheliegende Vacuolen unter gewissen Verhältnissen (z. B. bei Zusatz von Kalilauge) zusammenschmelzen;
4. daß sie auffallend leicht löslich sind in Alkohol, während Schwefel schwer auflöslich ist.

Molisch widerlegt nun auf Grund seiner Untersuchungen über Gasvacuolen bei schwebenden Cyanophyceen Willes Ansicht, daß die dunklen Körnchen bei Thiothrix Gasvacuolen sind. Dabei läßt er aber die Frage, ob die Körnchen nun wirklich aus Schwefel bestehen oder nicht, offen. Ja, er scheint sogar ziemlich bestimmt einen anderen Stoff in den Thiothrixzellen anzunehmen.

Ich habe nun diese Frage einer eingehenden Prüfung unterzogen, denn wäre die Ansicht der beiden eben genannten Forscher richtig, so müßte man Thiothrix aus der Reihe der Schwefelbakterien streichen. In einer Rohkultur wurde eine größere Menge von Thiothrixfäden gesammelt und gründlich gewaschen. Darauf ließ ich die Fäden auf einem Objektträger eintrocknen. Es traten dabei keine Veränderungen des Zellinhalts ein. Auch nicht, als ich bis 100° C erwärmte, erst nach stärkerem Erhitzen, bis über den Schmelzpunkt des Schwefels, zeigten sich deutliche Veränderungen. Die Fäden wurden zerstört, und als ich abkühlte, fand sich rund um die Stelle, wo die Thiothrixfäden gelegen hatten, ein gelber Ring, dieser verschwand bei nochmaligem Erhitzen des Objektträgers im Bunsenbrenner, wobei sich dann, dem Geruch deutlich wahrnehmbar, Dämpfe von Schwefligsäureanhydrid (SO_2) entwickelten. In den Resten der Thiothrixfäden war keine Spur schwarzer Körnchen mehr zu finden. (Nach neueren Untersuchungen scheint auch der Schmelzpunkt fein verteilter Stoffe tiefer zu liegen

[1]) N. Wille, Über Gasvacuolen bei einer Bakterie. Biolog. Zentralbl. 1902. S. 257—262.

[2]) Hans Molisch, Anhang zu: Die sogenannten Gasvacuolen und das Schweben gewisser Phycochromaceen. Bot. Ztg. 1903. 1. Abt. S. 57 u. 58.

als der für gleiche Stoffe in größeren Massen.) Ich habe dann weiter die Löslichkeitsverhältnisse des Schwefels von Beggiatoa und Thiothrix in Alkohol untersucht und gefunden, daß sich die Körnchen beider Formen gleichmäßig schnell auflösen. Daß mehrere naheliegende Vacuolen unter gewissen Umständen mit einander verschmelzen, hat bereits Winogradsky beschrieben; daß dies unter dem Einfluß von Kalilauge noch öfter der Fall ist, finde ich gar nicht so sonderbar, da es doch sehr wahrscheinlich ist, daß die Kalilauge organische Stoffe weglöst und so den halbflüssigen Schwefelkügelchen eine Verschmelzung erleichtert, da die in den lebenden Zellen sie einhüllenden Plasmamembranen zerstört sind. Außerdem überzeugte ich mich von der Schwefelnatur der dunklen Gebilde in den Thiothrixzellen durch einige Beobachtungen an Objektträger-Kulturen. Es zeigte sich, daß die Kulturen, die längere Zeit ohne H_2S-zufuhr blieben, ihren körnigen Inhalt verloren und zugrunde gingen. Wurde jedoch H_2S gegeben, so traten sehr schnell dunkle Kügelchen auf. Nach all dem, was diese Kulturen zeigten, kann ich nur nochmals sagen, daß sich alle diesbezüglichen Angaben Winogradskys bestätigten. Durch diese Darlegungen, hoffe ich, sind die von Wille aufgeworfenen Einwände wohl gänzlich gegenstandslos geworden, sodaß man Thiothrix ebenso wie Beggiatoa als ein fädiges Schwefelbakterium bezeichnen muß.

Eine Bestätigung dafür, daß Thiothrix als typisches Schwefelbakterium zu bezeichnen ist, mag auch noch der Nachweis bilden, daß hier wie bei Beggiatoa das Endprodukt der Schwefeloxydation Schwefelsäure ist. Da sich bei Winogradsky keine bestimmten Hinweise darauf fanden, daß er die Bildung von Schwefelsäure auch bei Thiothrix festgestellt hatte, habe ich den Nachweis zu führen gesucht. Zunächst wurde seine Methode mit Chlorbarium an Beggiatoa geprüft und dann mit gleichem Erfolg für Thiothrix angewendet, so daß ich mich auf Grund meiner Beobachtungen zu obigem Schluß berechtigt halte.

VI. Zusammenstellung der wesentlichen Resultate.

Die beiden Schwefelbakterienformen Beggiatoa und Thiothrix oxydieren Schwefelwasserstoff und speichern Schwefel auf; dieser besteht bei beiden Formen aus kleinen Tröpfchen weichen amorphen Schwefels.

Der Schwefel wird zu Schwefelsäure oxydiert und diese durch die vorhandenen Karbonate neutralisiert.

Ohne Schwefelwasserstoff können Lebens- und Bewegungserscheinungen nicht stattfinden, es tritt Absterben ein[1]).

---

[1]) Bis hierher waren die Resultate bereits Winogradsky bekannt.

Die Schwefelbakterien können in einer Flüssigkeit gedeihen, welche frei ist von jeder Spur organischer Stoffe.

Jedoch vermögen sie ohne Schädigung organische Stoffe in nicht zu hohen Konzentrationen zu ertragen, ohne dabei aber die geringste Förderung in ihren Lebensvorgängen zu erfahren. Notwendig ist eine nicht zu geringe Menge von Karbonaten der Alkalierdmetalle, die wahrscheinlich zur Bindung der Schwefelsäure dienen.

Beggiatoa und Thiothrix verwenden Ammoniumsalze als Stickstoffquelle.

Als Kohlenstoffquelle kommt allein Kohlensäure in Betracht.

Ich möchte nun noch die Schlußbetrachtung der Winogradskyschen Arbeit einer durch die vorliegenden Ergebnisse notwendig gemachten Prüfung unterziehen. Seine Annahme, daß wir in dem Schwefeloxydationsprozeß einen der Atmung entsprechenden Prozeß vor uns haben, wird durch diese Untersuchungen wohl bestätigt, zumal da nun der Nachweis geführt ist, daß eine Kohlensäure-Ausscheidung durch die Schwefelbakterien unmöglich ist, während Winogradsky doch mit der Möglichkeit einer solchen rechnet. Auch der Einwand, welchen Winogradsky sich selbst bei Besprechung der Wirkung organischer Stoffe macht, daß diese vielleicht doch günstig auf die Ernährung einwirken könnten, und daß die Schwefeloxydation nur ein Hilfsmittel ist, welches diese Organismen in nährstoffarmen Flüssigkeiten gebrauchen, ist durch die vorliegende Arbeit erledigt.

Als Anhang folgen nun noch einige genaue Protokolle und eine Übersicht über die Physiologie der bisher erforschten Bakterien mit autotropher Ernährung.

Die vorliegende Arbeit wurde im botanischen Institut der Universität Halle in der Zeit von Ostern 1911 bis Ostern 1912 unter Leitung von Herrn Professor Dr. Karsten und Herrn Dr. Pringsheim ausgeführt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Karsten und Herrn Dr. Pringsheim an dieser Stelle meinen herzlichen Dank für die mannigfachen Ratschläge bei der Ausführung der Arbeit auszusprechen.

Übersicht über die physiologischen Eigenschaften autotropher Bakterien.

		Energiequelle	Wirkung organischer Stoffe	Bedeutung des Sauerstoffes	Bedeutung der Kohlensäure	Stickstoffquelle	Temperaturwirkung	Name des Autors
Nitrobakterien	Nitritbakterien	NH_3	Organische Stoffe wirk. hemmend, bzw. aufhebend, nie ernährend	Sauerstoff ist zur Ernährung unbedingt notwendig	Fast sicher einzige Kohlenstoffquelle	Ammoniak (vielleicht auch Nitrit)	Grenzen 5° u. 55° 34° höchste Wirkung	Sergius Winogradsky [1]
	Nitratbakterien	$NaNO_3$	können sich an organ. Stoffe anpassen, aber sie nie verarbeiten		Wahrscheinlich einzige C-Quelle	Nitrite	Dgl.	" [2]
Eisenbakterien	Leptothrix ochracea	$FeH_2(CO_3)_2$	Org. Stoffe waren nur in geringen Mengen vorh. wahrscheinl. nicht nötig		Nach Winogr. wohl als C-Quelle verwendbar	Nitrate	Gut bei 23—25° 5° u. 40° Grenzen	" [3]
	Spirophyllum ferrugineum	$FeH_2(CO_3)_2$	In gering. Mengen nicht schädl., doch ohne Einfl. auf das Wachstum		CO_2 notw., doch läßt sich direkter Nachweis nicht führen		Ausgesprochen Kälte liebend 0—22°	Lieske [4]
Wasserstoffbakterien	Hydrogenomonas vitrea	H	Die organischen Stoffe können an Stelle des Wasserstoffes treten		Freie Kohlensäure kann nicht durch Karbonat ersetzt werden	NH_4Cl, vielleicht auch organische Stickstoffquelle	Am günstigsten 30—35°	Niklewski [5]
	Hydrogenomonas flava							
Methan-Bakt.	Bacillus methanicus	CH_4	Organische Stoffe in ihrer Wirkung nicht untersucht		Nicht notwendig, da C aus CH_4 verarbeitet	$MgNH_4PO_4$	Am günstigsten 30—37°	Söhngen [6]
Schwefelbakterien	Thionsäurebakterien	$Na_2S_2O_3$	Organische Stoffe nicht schädlich, doch auch nicht fördernd		CO_2 notwendig, organische Substanz ersetzt CO_2 nicht	KNO_3 oder NH_4Cl	—	Nathansohn [7]
	Beggiatoa, Thiothrix	H_2S	In schwach. Konzentr unschädl., jedoch ohne Einfluß auf Ernährung		CO_2 einzige Kohlenstoffquelle	Ammoniumsalze	0—42° Begg. 0–37° Thiothrix 30-35° am günst.	Winogradsky [8] Siehe auch vorliegende Arbeit

[1] [2] Sergius Winogradsky, 1890—91. Recherches sur les organismes de la nitrification. Annales Institut Pasteur. [3] Sergius Winogradsky, 1888. Bot. Ztg., Bd. 46, S. 261. [4] Rudolf Lieske, Jahrbücher für wiss. Botanik 1911, Bd. 49, S. 91. [5] Bronislaw Niklewski, Ein Beitrag zur Kenntnis wasserstoffoxydierender Mikroorganismen. I. Bull. Ac. Sc. Cracovie p. 911—932. 1906. II. Zentralblatt f. Bakteriologie etc. 2. Abt., Bd. 20, S. 469. [6] N. L. Söhngen, Zentralblatt für Bakteriologie. II. Abt., Bd. XX., Nr. 17/18, S. 513. [7] Alexander Nathansohn, 1902. Mitt. d. zoolog. Station Neapel, 15, 655. [8] Winogradsky, siehe Seite 1 dieser Arbeit.

Protokolle.

Glocke I.

15. 12. 11. Gasgemisch: 0,8 mm H_2S, 30 mm O, 25 mm CO_2, H. 6 Schalen mit natürlichem Langenbrücker Schwefelwasser und Beggiatoamaterial.

17. 12. Alle Fäden liegen in einem Klümpchen zusammen und sind tot. Wieder Kulturen in gleicher Weise angesetzt. Bei Impfen der Beggiatoen Reizung möglichst vermieden.

20. 12. Die Kulturen haben das gleiche Aussehen wie die am 17. Nochmals 9 neue Kulturen mit frischem Material.

23. 12. Wie am 17. und 20. Neue Kulturen.

24. 12. Kulturen von 23 tot. Also kann die Ursache des Absterbens nicht die lange Zeit sein, während welcher das Gemisch der Gase nicht erneuert wurde. Wieder 9 frische Kulturen.

27. 12. Da diese wieder tot sind anderes Gasgemisch: 0,8 mm H_2S, 20 mm O, 25 mm CO_2, H.

29. 12. Von den neuen Kulturen sind 8 gut, die Fäden kriechen auf dem Boden der Schale. Eine Kultur tot.

1. 1. 12. Die Petrischalen zeigen alle recht gute Beggiatoafäden. Diese bilden oft deutlich sichtbare, weiße Flecke.

3. 1. Wie am 1. 1.

6. 1. Desgl.

9. 1. Die Kulturen in den Schalen sind gut, doch meist kriechen die Fäden nicht weit auseinander.

12. 1. Desgl.

15. 1. Nichts Neues.

18. 1. Ebenso. Fäden wenig ausgebreitet.

20. 1. Neues Gasgemisch, da andere Glocken bei tieferem O-Druck bessere Kulturen aufweisen. 9 Kulturen.

23. 1. Die neun Kulturen sind ohne Ausnahme gut, die Fäden über die ganze Schale verbreitet. Die beiden besten

Kulturen sind zu Versuchen in kohlensäurearmer Atmosphäre verwendet. Dafür 2 neue.

26. 1. Fäden überall gut ausgebreitet, einzelne Schalen sehr rein, deutliche Vermehrung ist zu merken. Fäden sehr beweglich.

30. 1. Die Kulturen sehen sehr gut aus und haben sich stark vermehrt. Noch vier Schalen mit gutgewaschenem Material dazu.

4. 2. Alle Kulturen sehr schön, deutliche Vermehrung. An den Stellen, wo viele Fäden bei einander liegen, sind die sonst gleichmäßig ausgefallenen Kalkkristalle weggelöst.

7. 2. Alle Kulturen sehen sehr gut aus und zeigen deutliche Vermehrung, sind auch verhältnismäßig rein.

Jetzt nur 2 Kulturen mit natürlichem Wasser, alle anderen erhalten Nahrlösungen: 2 Kulturen mit Knop'scher, 2 mit Sachs'scher Nährlösung.

9. 2. Die zwei Kulturen in natürlichem Wasser sehr gut, die 4 anderen tot. Nochmals neue Kulturen: 2 mit Knop, 2 mit Sachs, 2 mit v. d. Crone.

13. 2. In den künstlichen Lösungen wieder alles tot. Die beiden alten gut. Nochmals neue Kulturen.

15. 2. Bis auf die 2 alten wieder alles tot. Nun künstliche Lösung (vergl. S. 29) mit $Ca(NO_3)_2$ in 6 neuen Kulturen.

17. 2. Wieder keine guten Resultate. Die zwei Kontrollkulturen sind ausgezeichnet. Nun k. L. + $Ca(NO_3)_2$ oder k. L. + $(NH_4)_2SO_4$ von jedem drei Kulturen.

20. 2. Bis auf die beiden alten wieder keine guten Resultate. Neue Kulturen, wie am 17.

23. 2. Alle neuen Kulturen schlecht.

26. 2. Desgl.

30. 2. Desgl.

2. 3. Da alle vereinfachten Lösungen nicht brauchbar sind habe ich eine Lösung hergestellt, die möglichst genau dem Langenbrücker Wasser entspricht. Dazu nun teils $Ca(NO_3)_2$, teils $(NH_4)_2SO_4$ (vergl. S. 30), teils keine Stickstoffverbindung. Von jedem 2 Kulturen.

5. 3. Die 6 neuen Kulturen sehen ziemlich schlecht aus, viele Fäden zerfallen, die lebenden nur langsam beweglich.

7. 3. Desgl. Die in N-freier Lösung anscheinend alle tot. Etwas besser die in den beiden anderen Lösungen.

9. 3. Desgl.

11. 3. Die Kulturen mit $(NH_4)_2SO_4$ zeigen ganz bedeutend besseres Aussehen, die Fäden haben sich deutlich verlängert.

13. 3. Alle Kulturen, besonders die mit k. W + $(NH_4)_2SO_4$ sehr gut. Die mit $Ca(NO_3)_2$ jedoch schlecht.

16. 3. Desgl. Kulturen mit $Ca(NO_3)_2$ tot.

(Da ich an Parallelkulturen in anderen Glocken bereits gute Reinkulturen erzielt hatte, prüfte ich nun auch die Kulturen aus Glocke I und benutzte zugleich die 6 verschiedenen Lösungen.) Die zwei alten Kulturen mit natürlichem Wasser sind sehr gut, haben sich stark vermehrt.

18. 3. Alle 8 Kulturen sehen sehr gut aus, die mit organischen Stoffen sind frei von anderen Bakterien. Noch 2 Kontrollkulturen mit k. W. + $(NH_4)_2SO_4$.

20. 3. Alles gut und rein. Sämtliche Kulturen zeigen völlig gleichmäßiges Verhalten der Fäden.

23. 3. Wieder alles gut. Die Kulturen mit $(NH_4)_2SO_4$ übertreffen die mit natürlichem Wasser an Schnelligkeit der Vermehrung. In den Lösungen (natürl. Wasser), die Ammoniumsalze enthalten, ist auch eine Steigerung festzustellen.

27. 3. Dieselben Resultate wie am 23. 3.

Die Notizen lauten nun ähnlich bis zum Abschluß der Untersuchungen am 14. 4. 1912.

Ebenso wie in Glocke I für Beggiatoa wurden in Glocke II für Thiothrix Versuche angestellt, die ganz entsprechend verliefen. Da die Protokolle der übrigen Glocken kaum etwas wesentlich Neues bringen, beschränkte ich mich auf die Wiedergabe der Notizen über zwei Versuchsreihen in kohlensäurefreier Atmosphäre.

Glocke IV.

24. 12. 11. Gasgemisch 0,8 mm H_2S, 30 mm Luft, 6 mm O, H. 4 sehr gute Kulturen verwendet.

29. 12. Alles tot. Nun Gasgemisch 0,9 H_2S, 15 mm O, 75 mm Luft. 6 neue, gute Kulturen, davon einige aus Glocke I. An Kohlensäure sind nur die Spuren aus den 75 mm Luft vorhanden.

1. 1. 12. Wieder alles tot. Nochmals neue Kulturen, sonst wie am 29.

3. 1. Wieder alles tot.

Die Versuche in dieser Form wurden fortgesetzt bis zum 26. 1. 12. Von da an wurde das oben (S. 10) angegebene Verfahren angewendet, um möglichst alle Spuren von Kohlensäure zu vermeiden. Die Versuchsreihe besteht aus drei sehr guten Kulturen aus Glocke I.

28. 1. Zwei dieser Kulturen sind tot.

29. 1. Die dritte ebenfalls tot.

Nun frische, teils länger in Kultur befindliche reine und andere erst aus Rohmaterial hergestellte Kulturen.

31. 1. Die erst frisch hergestellten Kulturen mit Rohmaterial sind nicht tot, die Fäden liegen alle rund um die Impfstelle herum, die in der Schale verstreuten Fäden sind alle tot. Im Mittelpunkt des Beggiatoenkreises befinden sich Paramaecien, Bakterien und Oscillarien, welche jedenfalls CO_2 für die Fäden liefern. Die reinen älteren Kulturen enthalten ausnahmslos tote Fäden. Auch Thiothrixkulturen sind schlecht, sogar die mit Verunreinigungen. (Wohl wegen der mangelnden Beweglichkeit.)

5. 2. 12. In einigen (5) Schalen (am 31. neu eingesetzt), die ohne Verunreinigungen sind, Schwefelbakterien tot. In den drei alten mit Verunreinigungen die bereits bekannte kreisförmige Anordnung um die Verunreinigungen.

12. 2. Die gleichen Ergebnisse wie bei den früheren Beobachtungen. In den drei alten, verunreinigten Kulturen sind die Fäden noch lebend. In den sechs neuen, reinen vom 5. 2. 12 keine lebendigen Fäden.

15. 2. Die gleichen Ergebnisse, die drei unreinen nicht schön.

19. 2. Neue reine und alte unreine Kulturen alle tot. Von diesem Tage an mit CO_2 und nun ausgezeichnete Kulturen.

Glocke V.

28. 1. 12. Gasgemisch 1,2 mm H_2S, 15 mm O, H, keine CO_2. Um die Kohlensäure möglichst zu beseitigen, wird die mit mehreren sehr guten Kulturen versehene Glocke möglichst weit ausgepumpt, dann kohlensäurefreie Luft, Schwefelwasserstoff und Wasserstoff, die beiden letzten Gase ohne besondere Behandlung hineingelassen.

31. 1. Mehrere Schalen mit Beggiatoa. In einigen sind die Fäden nicht tot, sondern haben sich in konzentrischen Kreisen um die Verunreinigungen in den Impfstellen geordnet. Die übrigen Schalen, die keine Bakterien und Paramaecien

enthalten, haben nur abgestorbene Fäden von Schwefelbakterien. Lebende Kulturen geblieben, sonst Ersatz.

4. 2. 6 Kulturen, davon 4 reine tot, die beiden anderen unverändert. Thiothrix zeigt hierbei Zerfall in kurze Glieder, die aber, unter günstige Bedingungen gebracht, nicht wieder zu neuen Rasen anwachsen. Man darf also nicht annehmen, die Thiothrixarten reagieren auf ungünstige Lebensbedingungen durch Bildung von Vermehrungszellen. Die Untersuchungen wurden in gleicher Weise fortgeführt bis zum

13. 2., jedoch ergab sich hierbei nichts wesentlich neues.

Lebenslauf.

Ich, Friedrich Gustav Keil, evangelischer Konfession, wurde am 2. Juni 1890 zu Weißenfels a. Saale als Sohn des Schuhmachermeisters Otto Keil geboren. Meinen ersten Unterricht erhielt ich in der Bürgerschule meines Heimatortes. Seit Ostern 1900 besuchte ich die Oberrealschule zu Weißenfels, die ich Ostern 1909 nach bestandener Reifeprüfung verließ. Seit dieser Zeit habe ich mich dem Studium der Mathematik und der Naturwissenschaften an der Universität Halle, der ich noch angehöre, gewidmet.

Während meiner Studienzeit besuchte ich Vorlesungen und Übungen folgender Herren Professoren und Dozenten:

Brüel, Cantor, Dorn, Eberhard, Fitting, Gutzmer, Haecker, Japha, Karsten, Menzer, Pringsheim, Schmidt, Taschenberg, Uphues, Wangerin.

Allen meinen Lehrern spreche ich an dieser Stelle meinen aufrichtigen Dank aus.